APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

GRUPO RIOPLATENSE DE CITOMETRÍA DE FLUJO – ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTNA

01/08/2016

Bioq. Esp. Hematología César Collino

Jefe Área Citometría de Flujo - Laboratorio Central - Hospital Rawson - PNLS (Programa Nacional de Lucha Contra el SIDA) - Córdoba – Argentina.

Departamento de Bioquímica Clínica - Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba - Córdoba-Argentina.

APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

- **CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO**

A). Control de Calidad de Muestras e Interlaboratorio

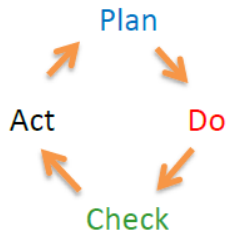
B). Control Instrumental – Compensaciones - Calibraciones

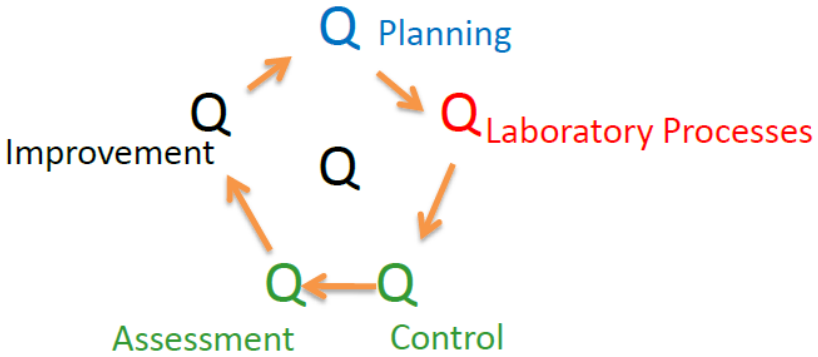
Términos y definiciones

-Sistema de Administración de la Calidad (*Quality Management System o QMS*): Sistema de gestión diseñado para dirigir y controlar una organización que tiene metas de calidad (ISO 9000). Nota: El QMS constituye un "proceso sistemático orientado" que es esencial para alcanzar los objetivos de calidad.

Quality Management System (QMS)?

El principio del QMS sigue la lógica del método científico y se describe a través del Ciclo PDCA: "Plan-Do-Check-Act" [Planificar-Hacer-Chequear-Actuar]





Términos y definiciones

Quality Planning (QP): También se denomina **Quality Design.** Consiste en establecer procedimientos que reúnen las necesidades de un proceso. Por ejemplo, aquí se diseñan los procedimientos para la Selección y Validación de un nuevo método así como el procedimiento de la Selección y Diseño de Statistical QC y el sistema de calidad analítica.

Quality Laboratory Processes (QLP): Refiere a la política, procedimientos, requisitos del Personal, recursos de infraestructura, etc., que determina como se hace el trabajo en el laboratorio. Los manuales de los métodos de laboratorio describen los procedimientos operativos estándares o SOPs (por *Standard Operating Procedures)* y los procedimientos para ejecutar los métodos de análisis.

Términos y definiciones

Quality Planning (QP): También se denomina **Quality Design.** Consiste en establecer procedimientos que reúnen las necesidades de un proceso. Por ejemplo, aquí se diseñan los procedimientos para la Selección y Validación de un nuevo método así como el procedimiento de la Selección y Diseño de Statistical QC y el sistema de calidad analítica.

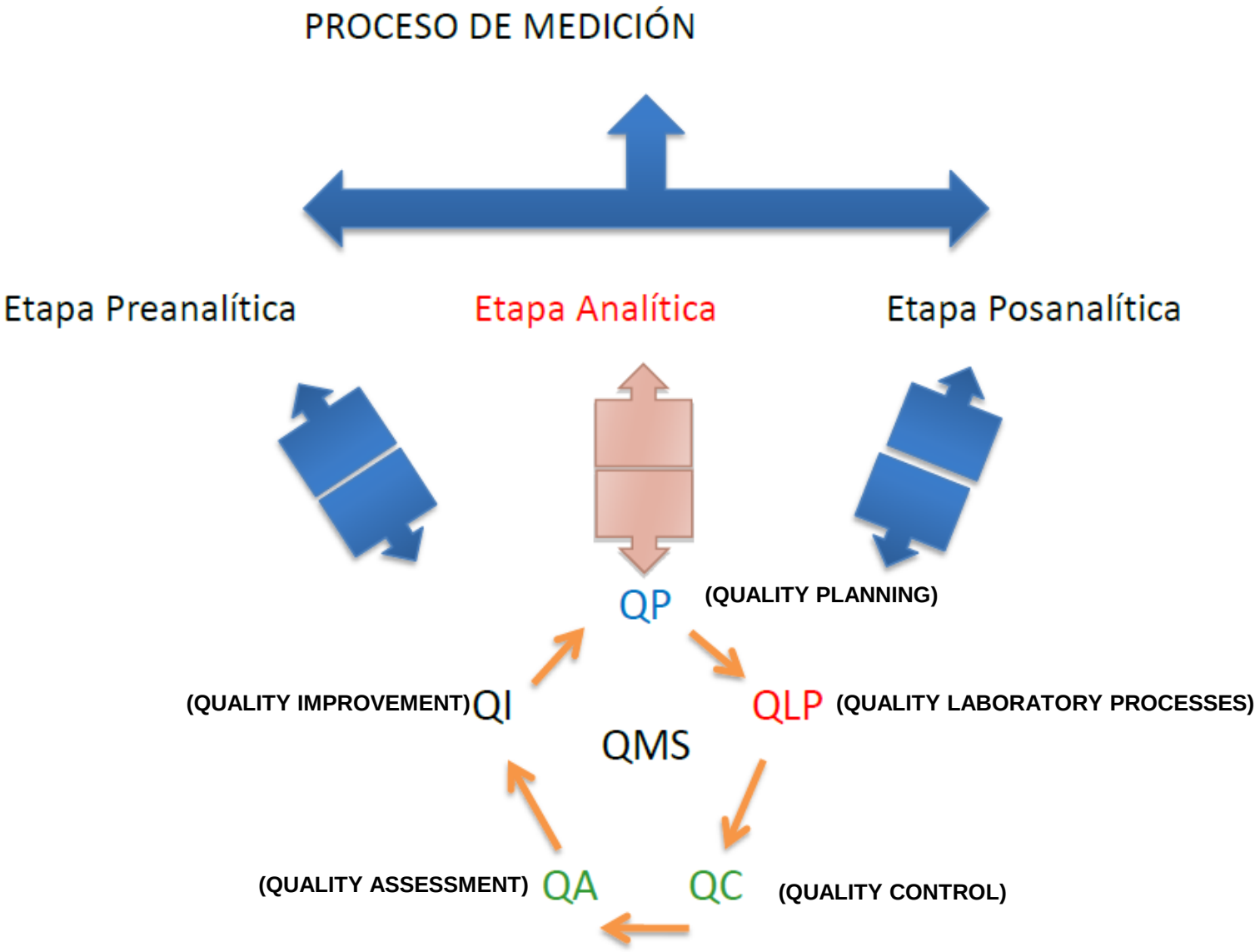
Quality Laboratory Processes (QLP): Refiere a la política, procedimientos, requisitos del Personal, recursos de infraestructura, etc., que determina como se hace el trabajo en el laboratorio. Los manuales de los métodos de laboratorio describen los procedimientos operativos estándares o SOPs (por *Standard Operating Procedures)* y los procedimientos para ejecutar los métodos de análisis.

Quality Control (QC): Refiere a los procedimientos para monitorear el proceso de trabajo, detectar problemas y hacer correcciones previo a emitir los productos o servicios. El QC estadístico (*Statistical QC*) es el mejor prodecimiento para monitorear la performance analítica del método de análisis.

Quality Assessment (QA): Refiere a un monitoreo más amplio de otras dimensiones u otras características de calidad tales como tiempo de realización de un ensayo, preparación del paciente, adquisición de muestras y reportes de resultados. Los Controles de Calidad Externos proveen una medición externa de la performance. **Nota: el uso del término *assessment* en cambio de *assurance* le da énfasis al carácter cuantitativo de la calidad**.

Quality Improvement (QI): La idea es determinar las CAUSAS u ORIGENES de los problemas que son identificados en el QC y en el QA.

Aspectos Generales de la Medición



APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

- Estudio de DNA (Ploidía Celular): Ciclo Celular/Apoptosis

- Estudios de Cross Match

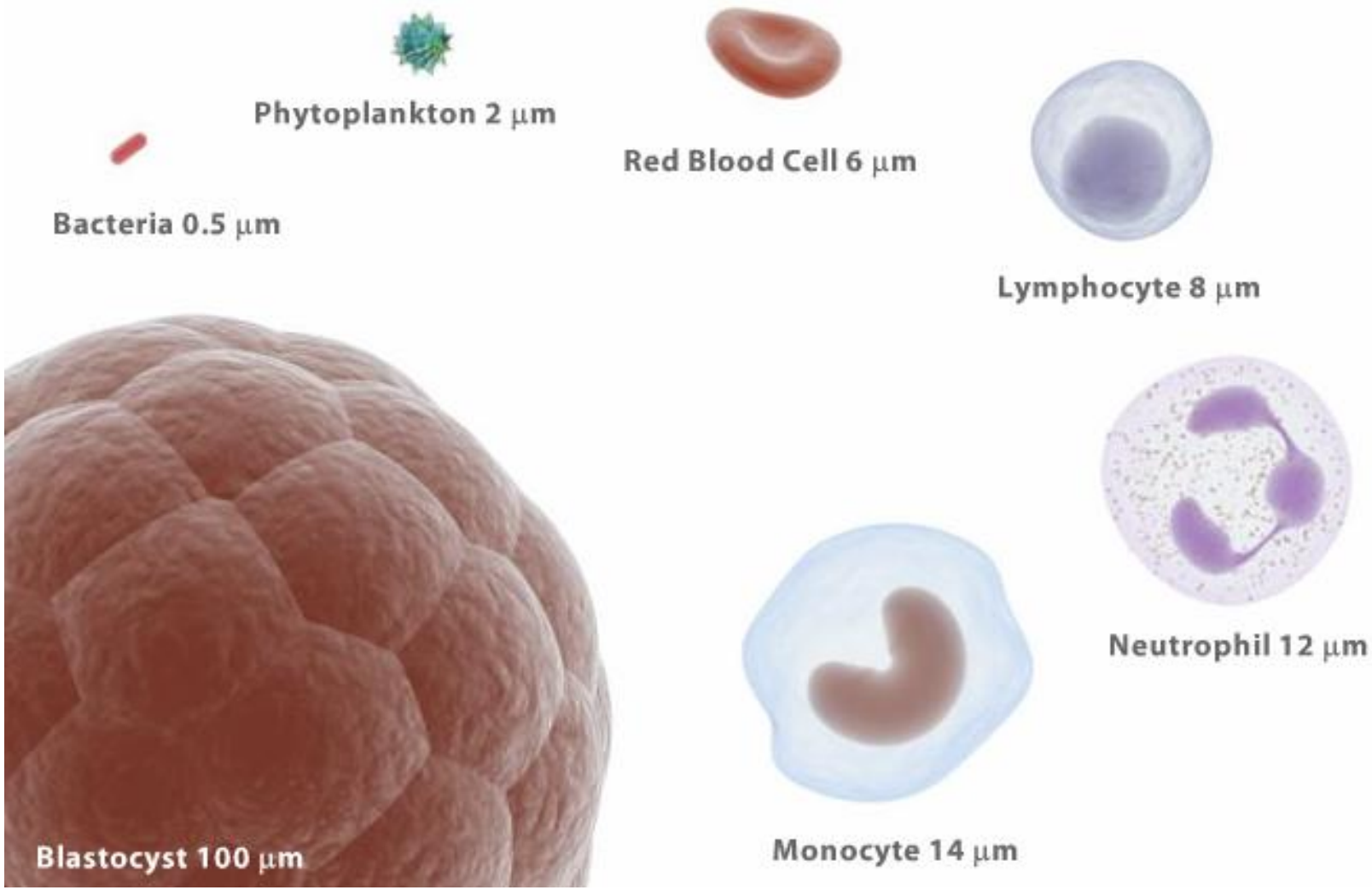
- Aplicaciones diversas en microbiología

- Estudios de Eritrocitos

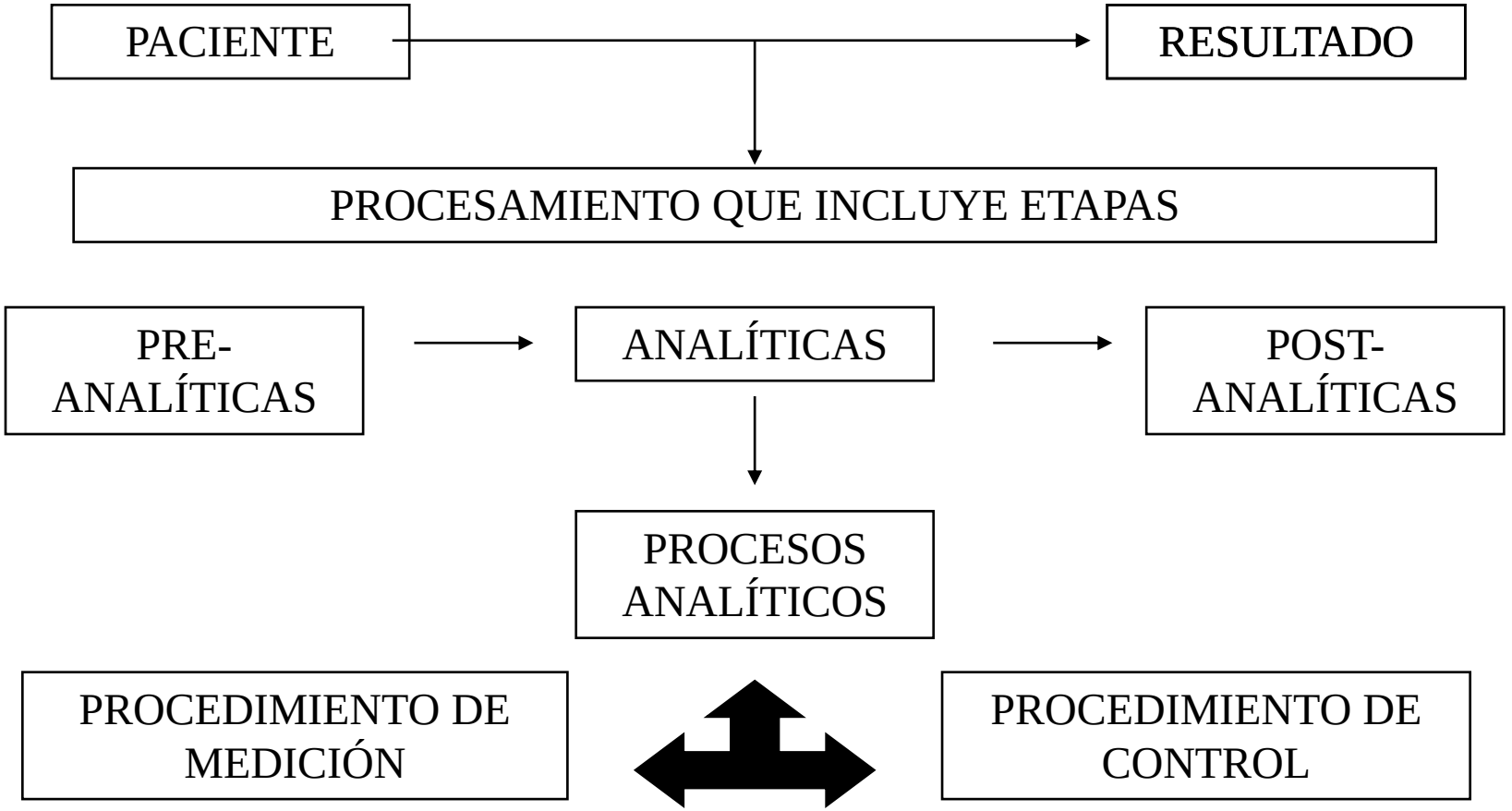
- Estudio de funcionalismo celular: Fagocitosis, Flujo de Calcio, Estallido respiratorio.

- Inmunofenotipificación celular: Estudio de Neoplasias Hematologicas, Estudio de Subpoblaciones Linfocitarias, Estudio

CAPACIDAD DEL SISTEMA



ASPECTOS GENERALES DE LA MEDICIÓN



Aspectos Metrológicos de la Medición:

•Validación/Evaluación Analítica de Métodos

•Rastreabilidad (Traceability)

Control de Calidad

• Interno

• Externo

SEGURIDAD ANALÍTICA DE UN SISTEMA DE MEDICIÓN

Requerimientos de Calidad

Estándares de ejecución analítica que aseguran el resultado de un método de medición generalmente vinculado con el interés clínico del mesurando.

Generalmente se expresan en términos de:

- ***Error Total Aceptable**
- ***Imprecisión aceptable y**
- ***Veracidad [trueness] medida en términos de un bias aceptable**

Entidades de mayor difusión de Requerimientos de Calidad en Química Clínica:

- ***CLIA'88 (USA)**
- ***EQA (Europa)**

Fuentes Requerimientos de Calidad

1 CLIA - CLIA '88 Proficiency Testing Limits, U.S. Federal Register.

2 WLSH

WSLH Proficiency Testing is a national, full-service PT program located at the Wisconsin State Laboratory of Hygiene on the campus of the University of Wisconsin - Madison. (undated, approx June, 2004). For more information, visit www.slh.wisc.edu/pt.

3 NYS

Wadsworth Center Clinical Laboratory Evaluation Program, *Guide to Program Requirements and Services*, New York State Department of Health (undated, approx June, 2004). For details, visit www.wadsworth.org/labcert.

4 CAP

College of American Pathologists Participant Summary, April 2004. Special thanks to Dr. Veronica Luzzi and Dr. Frank Wians, UT Southwestern Medical Center, for compiling this list from their participant report.

5 BV

Spanish Society of Clinical Chemistry and Molecular Pathology (SEQC) table of Desirable Quality Specifications based on Biological Variation, 2004 Update. For details, visit www.westgard.com/guest26.htm

6 AAB

American Association of Bioanalysts Table of Grading Limits (undated, approx Oct 2005). For details, visit www.aab.org/pts/grdlim.htm

7 RCPA

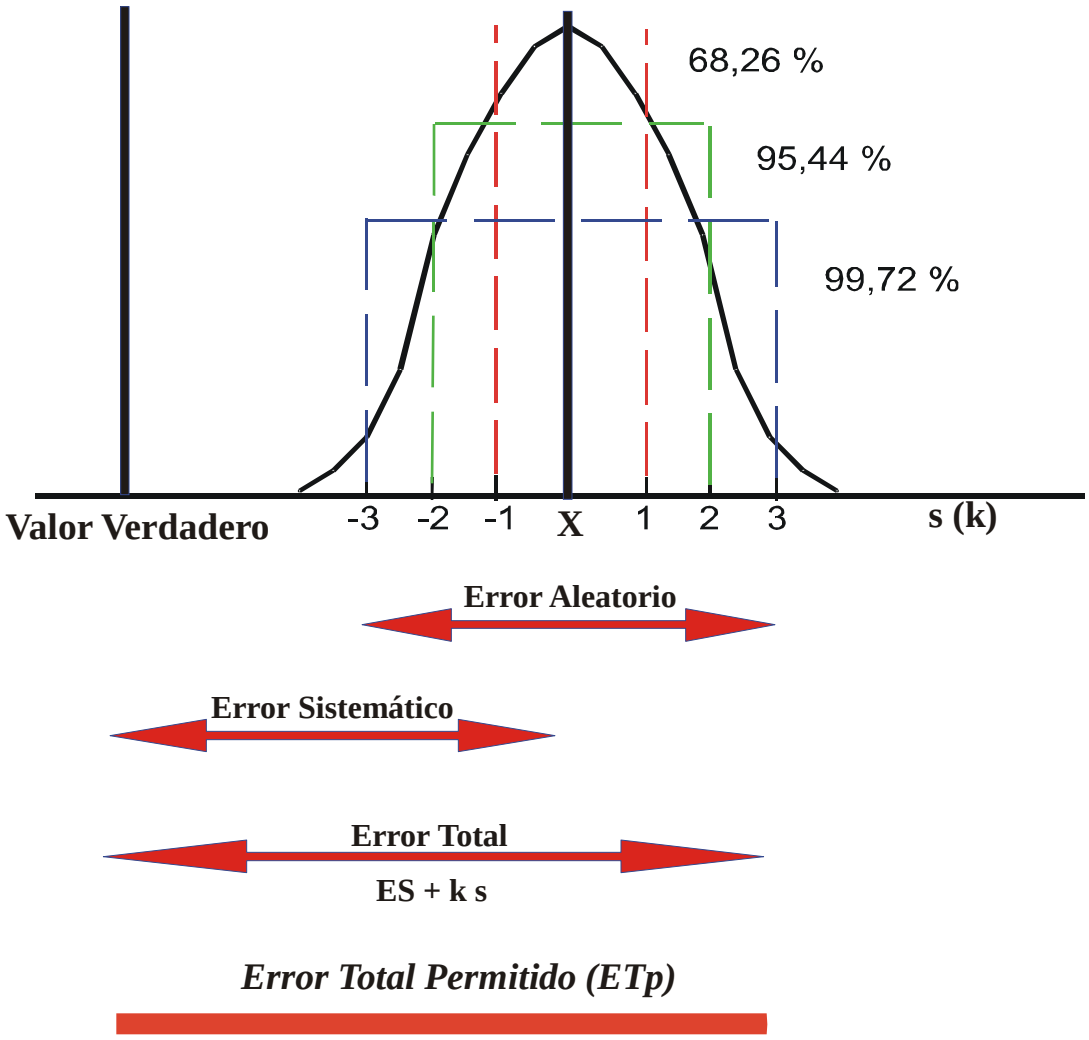
Royal College of Pathologists of Australasia and the Australasian Clincal Biochemist association Quality Assurance Program

8 CFX

"Canadian Fixed Limits", The College of Physicians and Surgeons of Saskatchewan

www.dgrhoads.com/db2004/aerefs.htm

ERROR TOTAL

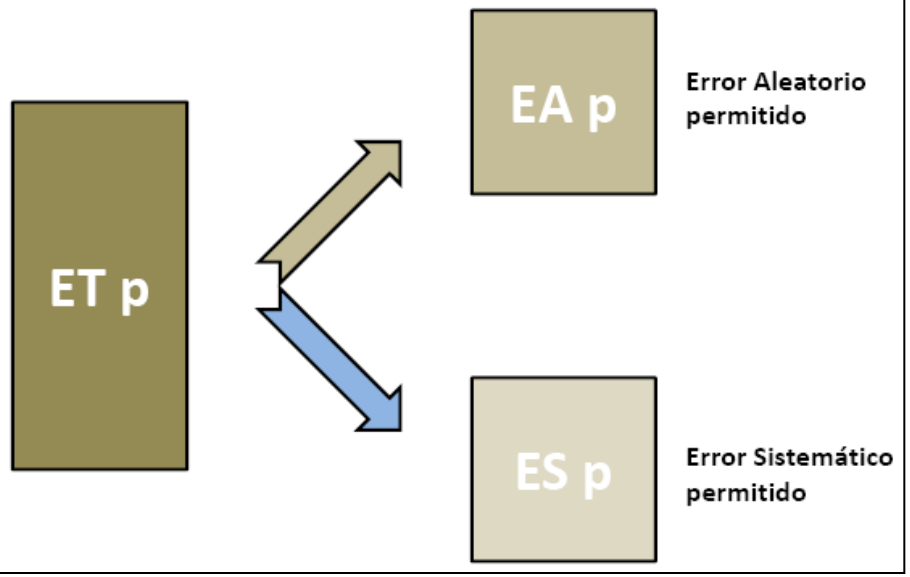

68,26 %
95,44 %
99,72 %
Valor Verdadero
-3
-2
-1
X
1
2
3
s (k)
Error Aleatorio
Error Sistemático
Error Total
ES + k s
Error Total Permitido (ETp)

Requerimientos de Calidad

	Analyte	Biological Variation		Desirable specification		
		CVw	CVg	I(%)	B(%)	TE(%)
S-	Calcium	1.9	2.8	1.0	0.8	2.4
U-	Calcium, concentration, 24h	27.6	36.6	13.8	11.5	34.2
U-	Calcium, ionized	1.7	2.2	0.9	0.7	2.1
U-	Calcium, output, 24h	26.2	27.0	13.1	9.4	31.0
S-	Carbohydrate deficient transferrin	7.1	38.7	3.6	9.8	15.7
S-	Carcinoembryonic antigen (CEA)	12.7	55.6	6.4	14.3	24.7
B-	CD4 lymphocyte count	25.0	---	12.5	---	---
S-	Ceruloplasmin	5.8	11.1	2.9	3.1	7.9
S-	Chloride	1.2	1.5	0.6	0.5	1.5
S-	Cholesterol	6.0	14.9	3.0	4.0	9.0

www.westgard.com

PRESUPUESTOS DE ERROR



CASO MÍNIMO

ET p

1 DE p	25 %
1 DE p	25 %
ES p	50 %

Se asigna un 50 % del Error Total permitido al Error Sistemático permitido y el otro 50 % se reparte en dos Desviaciones Estándar permitidas.

ET p = ES p + 2 EA p

REGLA DEL 25%

ET p

1 DE p	25 %
1 DE p	25 %
1 DE p	25 %
ES p	25 %

Se asigna un 25 % del Error Total permitido al Error Sistemático permitido y el 75 % restante se divide en tres Desviaciones Estándar permitidas.

ET p = ES p + 3 EA p

SIX SIGMA

ET p

1 DE p	16,7 %
1 DE p	16,7 %
1 DE p	16,7 %
1 DE p	16,7 %
0,5 DE p	8,3 %
ES p	25 %

Se asigna un 25 % del Error Total permitido al Error Sistemático permitido y el 75 % restante se divide en 4,5 Desviaciones Estándar permitidas.

ET p = ES p + 4,5 EA p

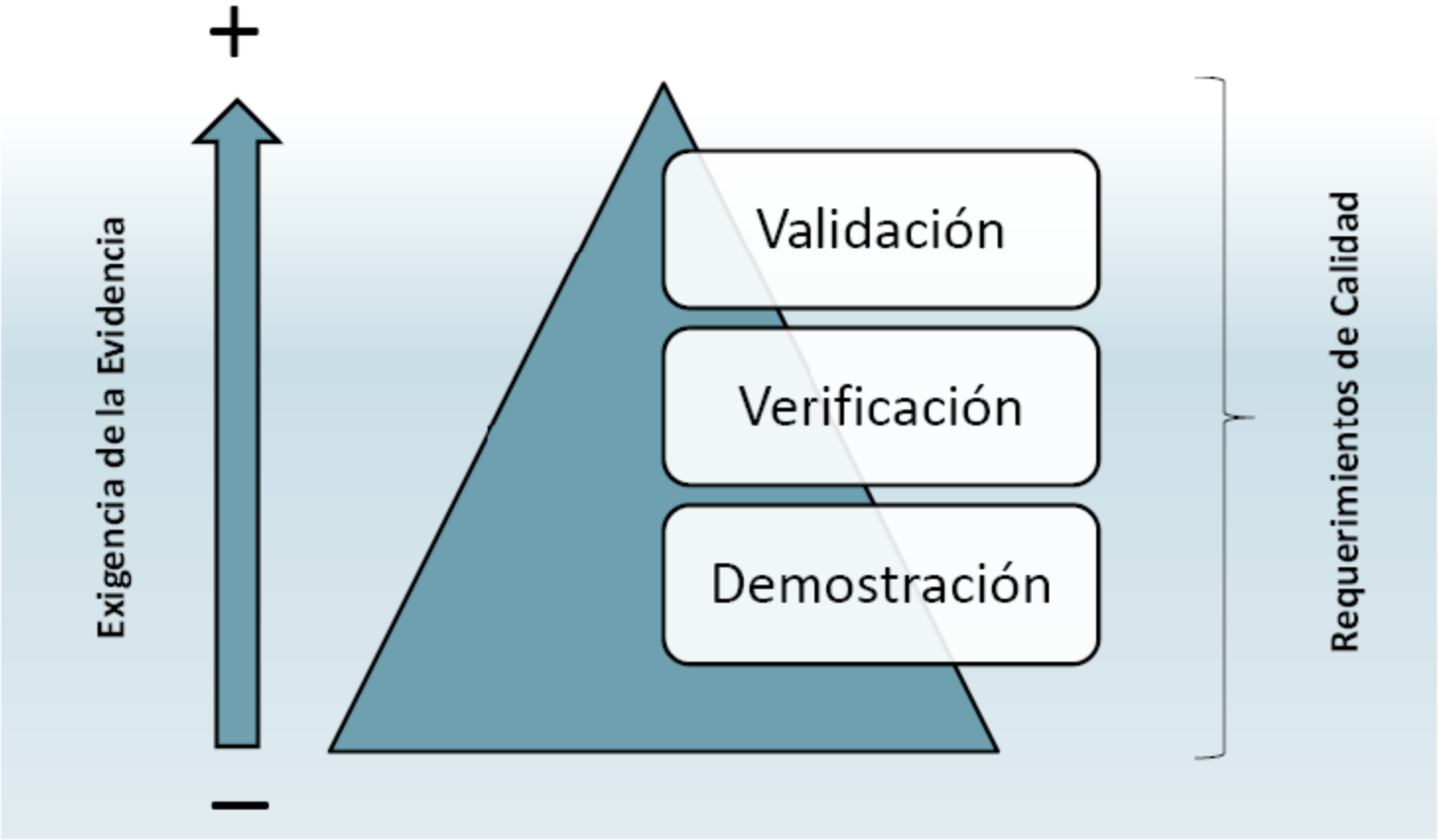
Requerimientos de Calidad

	Analyte	Biological Variation		Desirable specification		
		CVw	CVg	I(%)	B(%)	TE(%)
S-	Calcium	1.9	2.8	1.0	0.8	2.4
U-	Calcium, concentration, 24h	27.6	36.6	13.8	11.5	34.2
U-	Calcium, ionized	1.7	2.2	0.9	0.7	2.1
U-	Calcium, output, 24h	26.2	27.0	13.1	9.4	31.0
S-	Carbohydrate deficient transferrin	7.1	38.7	3.6	9.8	15.7
S-	Carcinoembryonic antigen (CEA)	12.7	55.6	6.4	14.3	24.7
B-	CD4 lymphocyte count	25.0	---	12.5	3,1%	18,2%
S-	Ceruloplasmin	5.8	11.1	2.9	3.1	7.9
S-	Chloride	1.2	1.5	0.6	0.5	1.5
S-	Cholesterol	6.0	14.9	3.0	4.0	9.0

www.westgard.com

SEGURIDAD ANALÍTICA DE UN SISTEMA DE MEDICIÓN

Jerarquía de la Evidencia Objetiva



¿Cuándo Validar, Verificar o Demostrar?

- Las recomendaciones que se deben seguir dependen de la complejidad de los Métodos.
- Para CLIA'88 y FDA (*Food and Drug Administration*) existen tres categorías: los *waived test* (conocidos como de Baja Complejidad), los de Moderada y los de Alta Complejidad (ambos *non-waived test*).
- Los *waived test* para FDA son definidos como determinaciones simples de laboratorio (*home use*), con probabilidad de resultados erróneos insignificante y que no conllevan un riesgo importante para el paciente si los resultados son incorrectos.
- Para diferenciar entre moderada y alta complejidad, se define un sistema de *Score*: Un método es evaluado siguiendo 7 criterios de categorización. Para cada criterio, un método recibe un *score* que va de 1 a 3. Al final, los *scores* de los diferentes criterios se totalizan. Un *score* total de 12 ó menos define un método de moderada complejidad, mientras uno de más de 12 determina un método de alta complejidad.

http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCLIA/clia.cfm

Criterios de Categorización

- Conocimiento.
- Entrenamiento y experiencia.
- Preparación de reactivos y materiales.
- Características de pasos operacionales.
- Calibración, Control de Calidad, y materiales para la evaluación externa de la Calidad.
- Estrategias para identificar y solucionar problemas y para mantener el sistema.
- Interpretación y toma de decisiones.

http://www.fda.gov/cdrh/CLIA/categorization.html

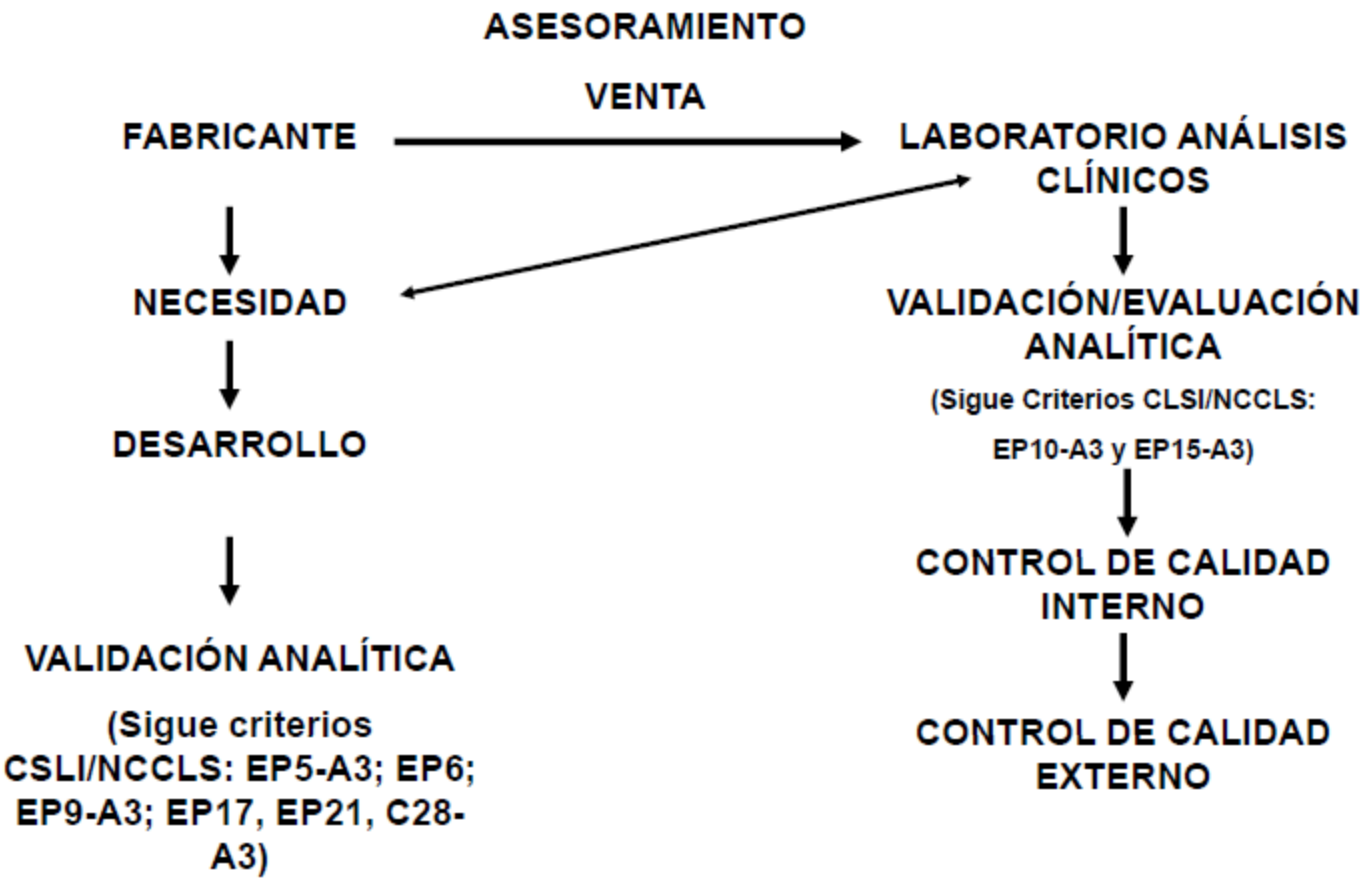
CLIA - Clinical Laboratory Improvement Amendments

New Search Back To Search Results

Test System Name	All Nonautomated ESR Procedures
Analyte Name	Erythrocyte Sedimentation Rate,nonautomated waived
Analyte Specialty	Hematology
Complexity	WAIVED
Effective Date	07/26/1993

Page Last Updated: 05/20/2009

ESQUEMA DE DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE EQUIPOS DIAGNÓSTICOS PARA USO IN VITRO EN LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS



$$Error\ Total = |Error\ Sistemático\ Total| + Error\ Aleatorio$$

$$ET = |EST| + EA = |(bX_c - X_c) + a| + kS_T$$

Determinación del Error Aleatorio de un método analítico

$$EA = kS_T$$ } Experimentos de evaluación de Precisión (EP5-A2 CLSI)

Cálculo del Error Sistemático Total de un método analítico

$$EST = ESP + ESC$$ } Experimentos de evaluación de Veracidad (EP9-A2 CLSI)

Error Sistemático Proporcional:

$$ESP = bX_c - X_c$$

Error Sistemático Constante:

$$ESC = a$$

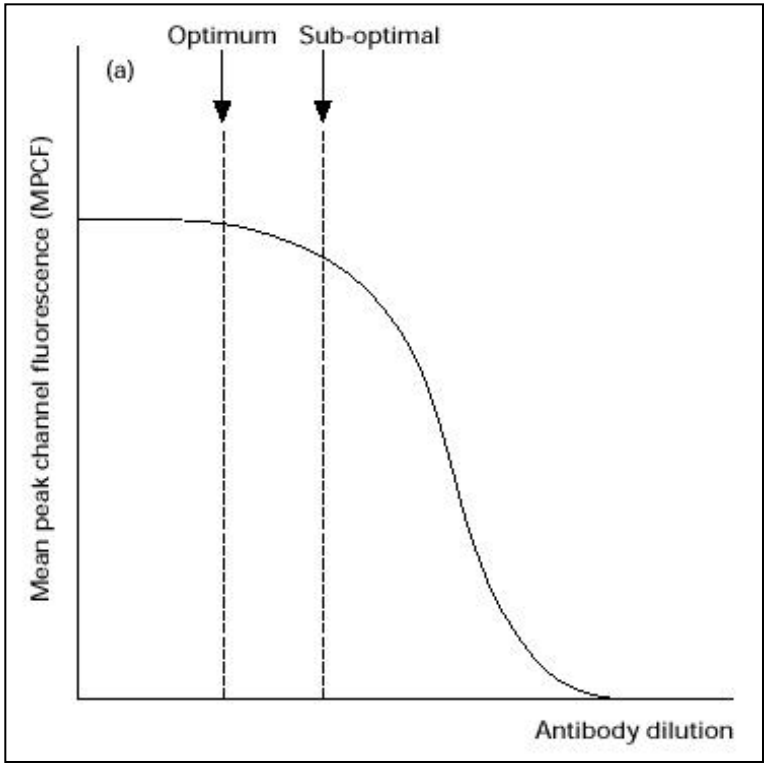
Etapas de una Validación Analítica

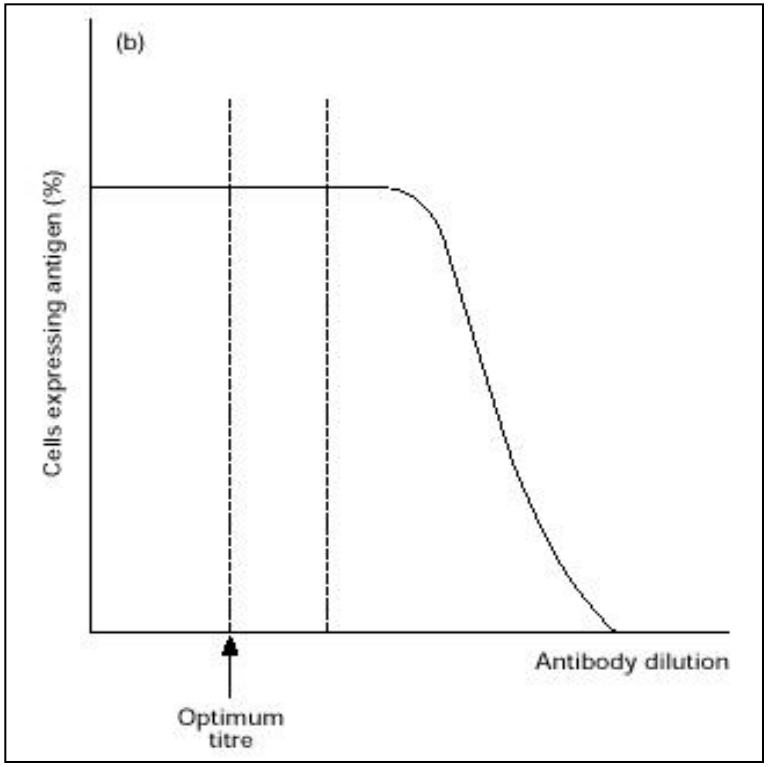
- Período de entrenamiento (familiarización), alcance
- Precisión: Repetibilidad
  Intermedia
  Reproducibilidad
- Linealidad
- Límite de detección (LOD)
- Límite de cuantificación (LOQ)
- Exactitud
- Robustez / Monitoreo de la performance

CLIA´88 (Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988)

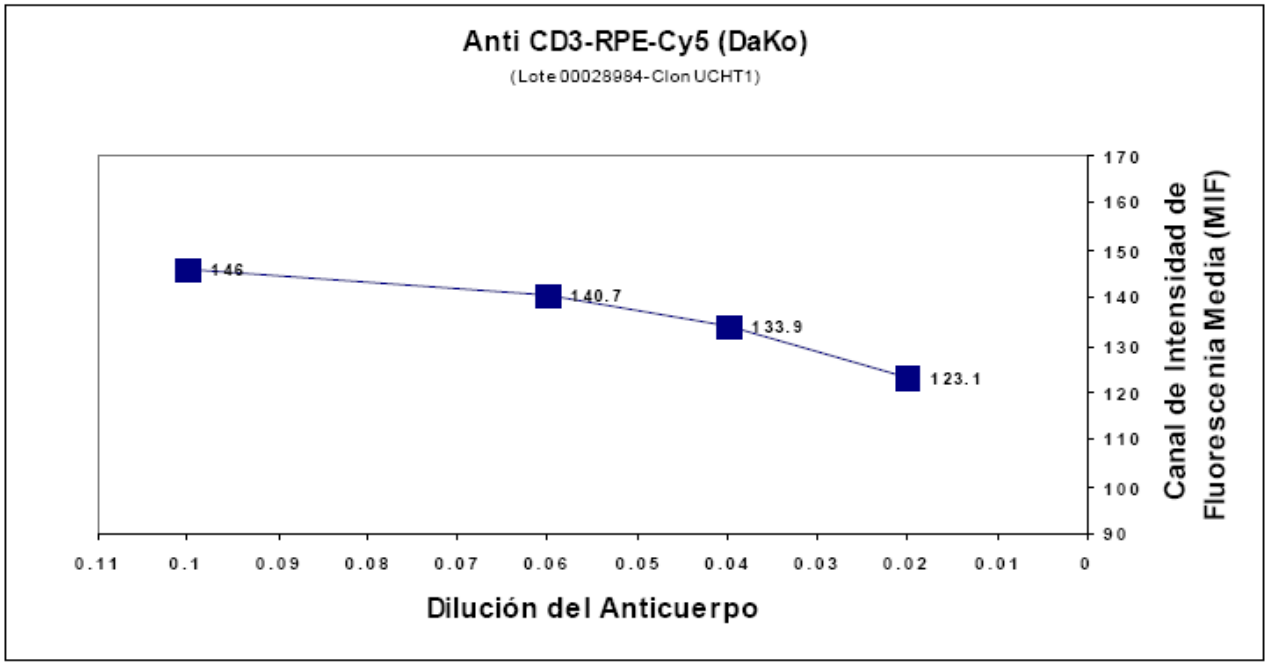
CLSI-NCCLS (Clinical and Laboratory Standard Institute) - (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

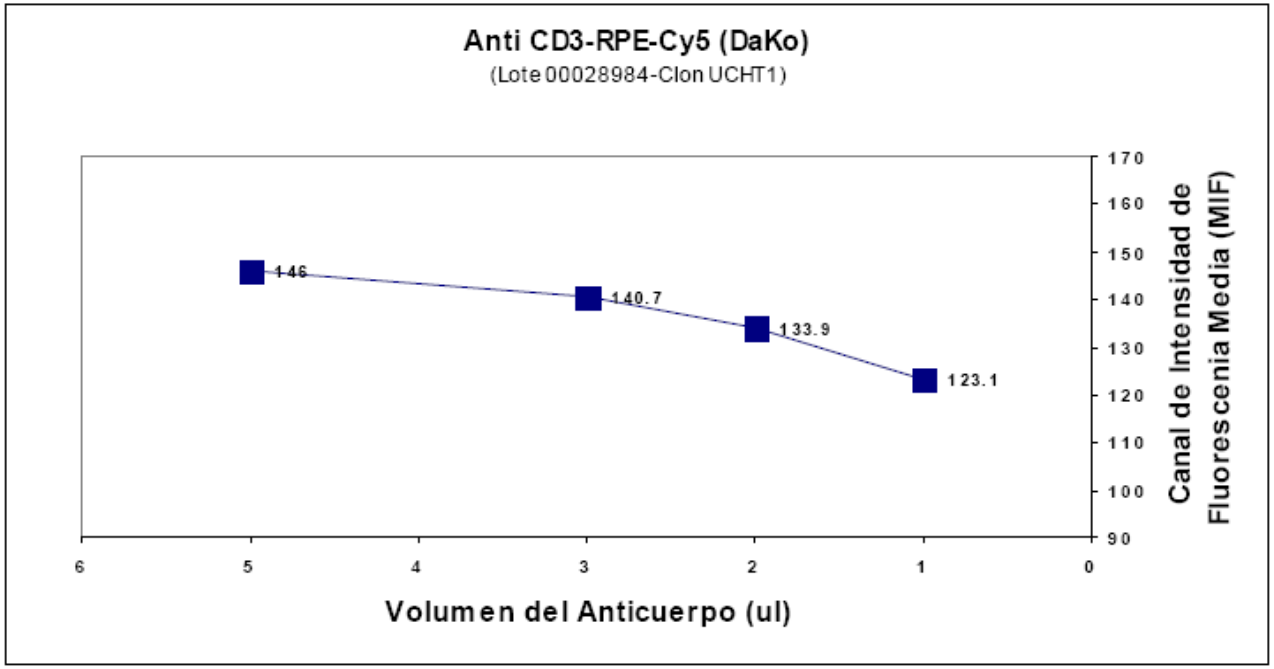
Titulación de los Anticuerpos



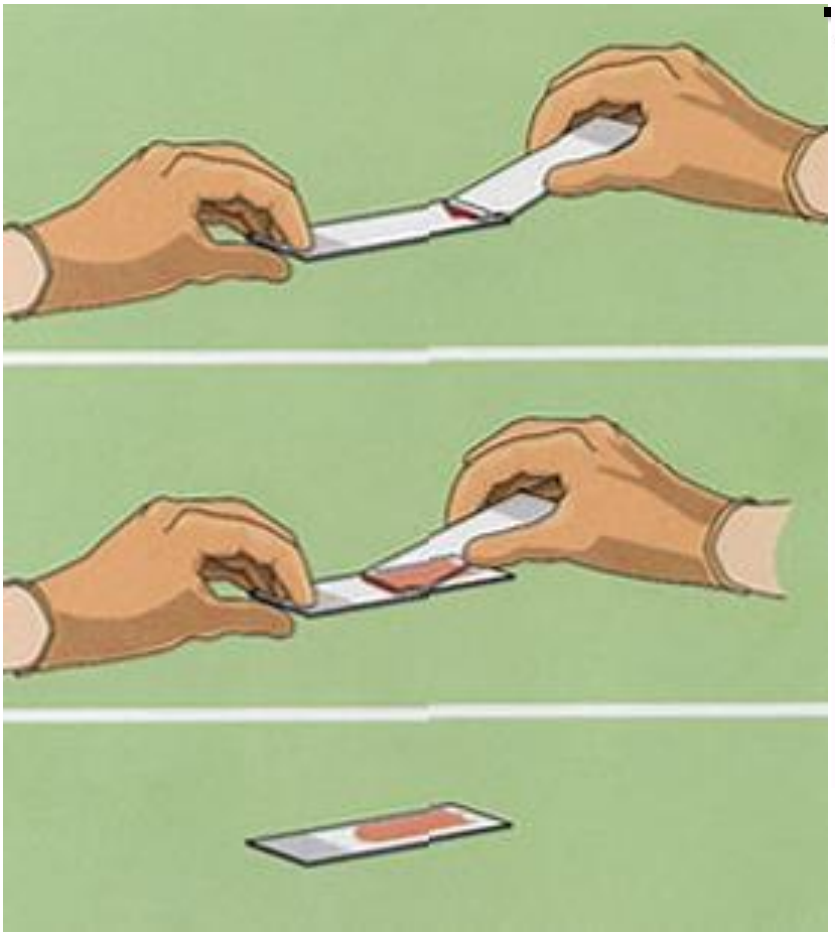


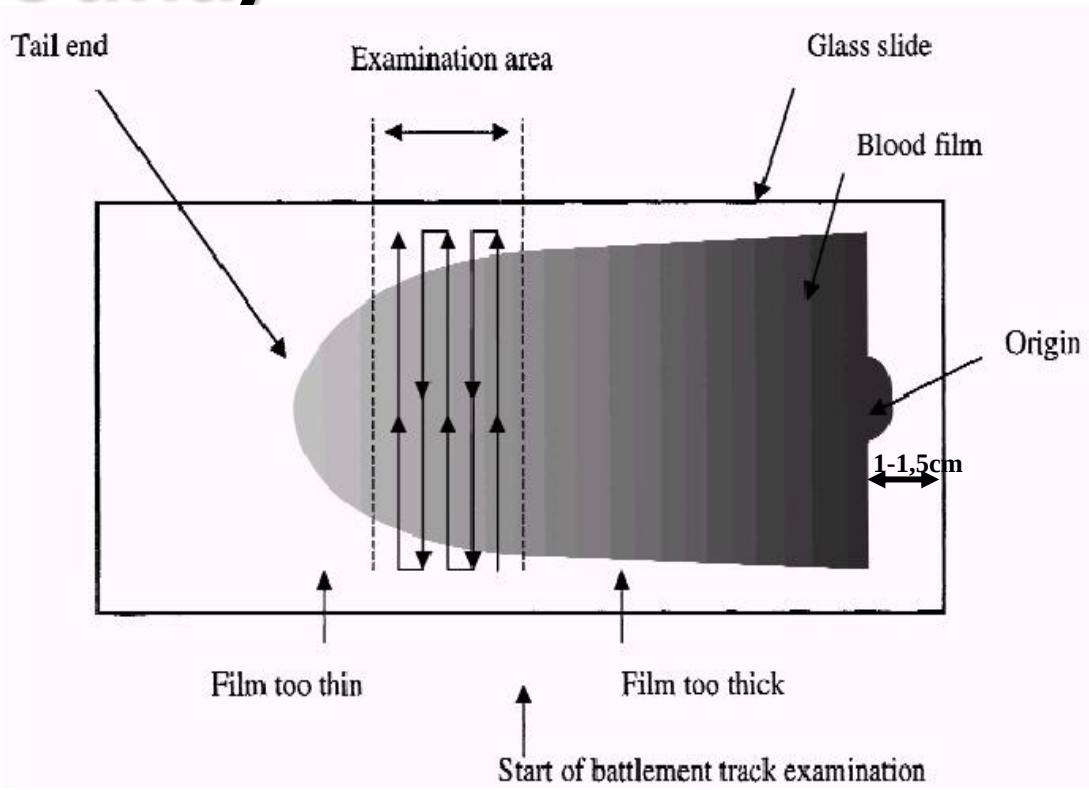
Clin Lab Haem. 1996,18,1-5


Anti CD3-RPE-Cy5 (DaKo)
(Lote 00028984-Clon UCHT1)
146
140.7
133.9
123.1
170
160
150
140
130
120
110
100
90
0.11
0.1
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
Canal de Intensidad de Fluorescenia Media (MIF)
Dilución del Anticuerpo


Anti CD3-RPE-Cy5 (DaKo)
(Lote 00028984-Clon UCHT1)
146
140.7
133.9
123.1
170
160
150
140
130
120
110
100
90
6
5
4
3
2
1
0
Canal de Intensidad de Fluorescenia Media (MIF)
Volumen del Anticuerpo (ul)

Frotis de Sangre Periférica (Método de Cuña)





a (Observed Percentage of Specific Cell Type)	*n* (Total Cells Counted in Differential)			
	100	*200*	*500*	*1000*
0	0 4	0 2	0 1	0 1
1	0 6	0 4	0 3	0 2
2	0 8	0 6	0 4	1 4
3	0 9	1 7	1 5	2 5
4	1 10	1 8	2 7	2 6
5	1 12	2 10	3 8	3 7
6	2 13	3 11	4 9	4 8
7	2 14	3 12	4 10	5 9
8	3 16	4 13	5 11	6 10
9	4 17	5 14	6 12	7 11
10	4 18	6 16	7 13	8 13
15	8 24	10 21	11 19	12 18
20	12 30	14 27	16 24	17 23
25	16 35	19 32	21 30	22 28
30	21 40	23 37	26 35	27 33
35	25 46	28 43	30 40	32 39
40	30 51	33 48	35 45	36 44
45	35 56	38 53	40 50	41 49
50	39 61	42 58	45 55	46 54

* *Confidence coefficient, 95%.*

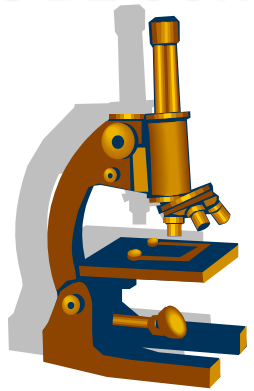
Example: If 6% monocytes were identified in a 100-cell differential (n = 100), there is a confidence coefficient of 95% that the true value is between 2% and 13% and a 5% chance that it is not.

For a over 50, obtain confidence limits by reading limits for 100 − a in the table and subtracting them from 100.

Example: The 95% confidence limits for 75% neutrophils counted in a sample where 100 cells were counted (n = 100) are between 65% and 84%.

From Rumke CL: Variability of results in differential counts on blood smears. Triangle, Sandoz Journal of Medical Science 4:156, 1960. Copyright Sandoz Ltd, Basle, Switzerland, with permission.

ESTABLECIMIENTO DE LÍMITES DE CONFIANZA



SEGURIDAD ANALÍTICA DE UN SISTEMA DE MEDICIÓN

CONTROL DE CALIDAD LAB. ANALISIS CLÍNICOS

Control de la calidad en laboratorios de análisis clínicos: Son procesos estadísticos aplicados por el personal del laboratorio para monitorear y evaluar la estabilidad analítica de un método de análisis clínicos, con el objeto de suministrar resultados confiables al personal médico y/o a los pacientes. El proceso requiere:

• Análisis regulares de muestras controles en una misma corrida analítica junto con las muestras de los pacientes.

• Comparación de los resultados de las muestras controles con límites de confiabilidad establecidos a partir de la performance analítica del método previamente validado/verificado.

Los controles de la calidad en los laboratorios de análisis clínicos son:

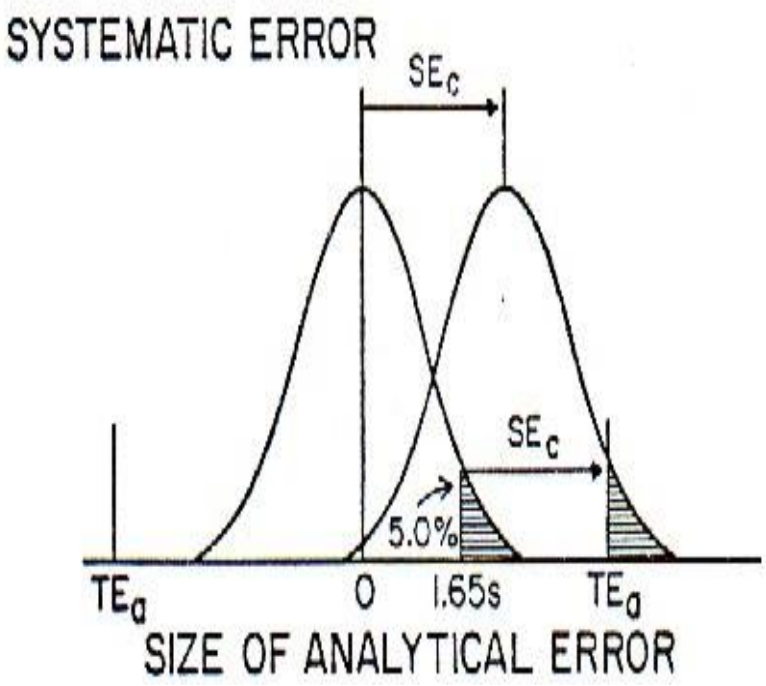
Reglas de Control de Calidad

Regla Control	Definición	Cambio detectado
1-2s	1 resultado > ± 2,0 DE	Aleatorio o Sistemático
1-2,5s	1 resultado > ± 2,5 DE	Aleatorio o Sistemático
1-3s	1 resultado > ± 3,0 DE	Aleatorio o Sistemático
1-3,5s	1 resultado > ± 3,5 DE	Aleatorio o Sistemático
1-4s	1 resultado > ± 3,5 DE	Aleatorio o Sistemático
2-2s	2 resultados consecutivos > ± 2,0 DE	Sistemático
4-1s	4 resultados consecutivos > (+ o -) 1 DE	Sistemático
10x	10 resultados consecutivos por arriba o debajo de la media	Sistemático
R-4s	El rango entre dos resultados consecutivos o 2 controles en la misma corrida excediendo 4 DE	Aleatorio
3-1s	3 resultados consecutivos > (+ o -) 1 DE	Sistemático
12x	12 resultados consecutivos por arriba o debajo de la media	Sistemático

Error Sistemático Crítico (ΔSEc): Es el tamaño del error sistemático que debe ser detectado para mantener los requerimientos de calidad definidos. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

ΔSEc = [(TEa – bias)/s] – 1,65 (cuando el bias ≠ 0)

Donde TEa es el error total aceptable, bias (inexactitud) y s (imprecisión) obtenidos de los ensayos de Evaluación de Métodos.



CALCULO DEL ERROR CRÍTICO SISTEMÁTICO (ΔSEc).

SEc = TEa – 1,65.S;

Para transformar al SEc en múltiplos de S, se dividen ambos términos por S:

SEc/S = (TEa – 1,65.S)/S = (TEa/S) – 1,65

SEc/S = ΔSEc = (TEa/S) –1,65 (cuando el bias = 0);

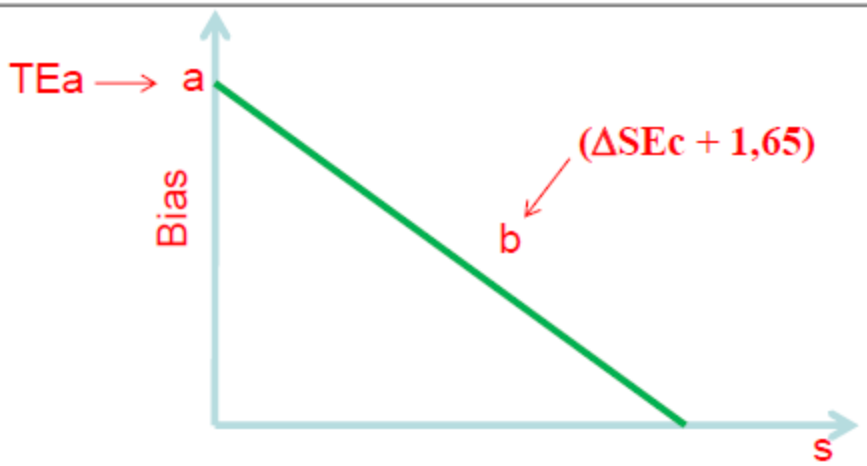
ΔSEc = [(Tea – bias)/S] – 1,65 (cuando el bias ≠ 0)

$$\Delta SEc = [(TEa - bias)/s] - z$$

Reordenando la ecuación en términos de *bias* y *s* para un límite de confidencia del 90% (z = 1,65):

$$bias = TEa - (\Delta SEc + 1,65) \cdot s$$

$$(Y = a - b \cdot X)$$



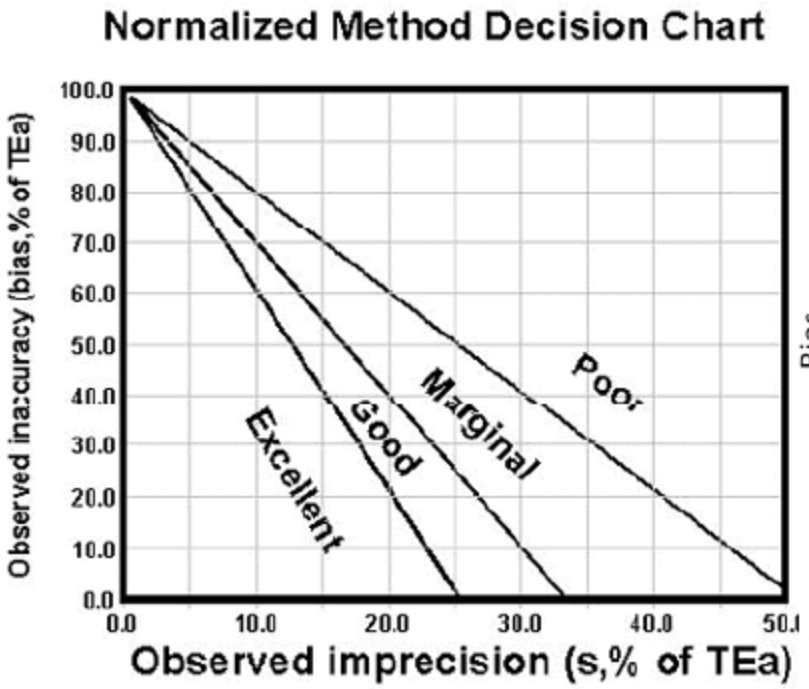
A este tipo de gráfica se le denomina:

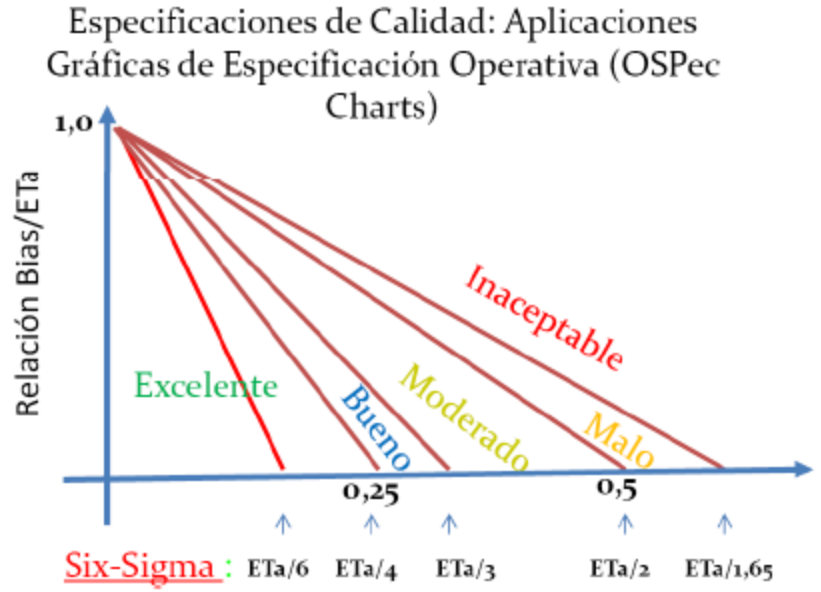
Cartas ó Diagramas de Especificaciones Operativas (OPSpecs Chart)

ó Diagramas OPSpecs

Las OPSpecs Chart representan una herramienta práctica en la planificación del Control de Calidad Interno

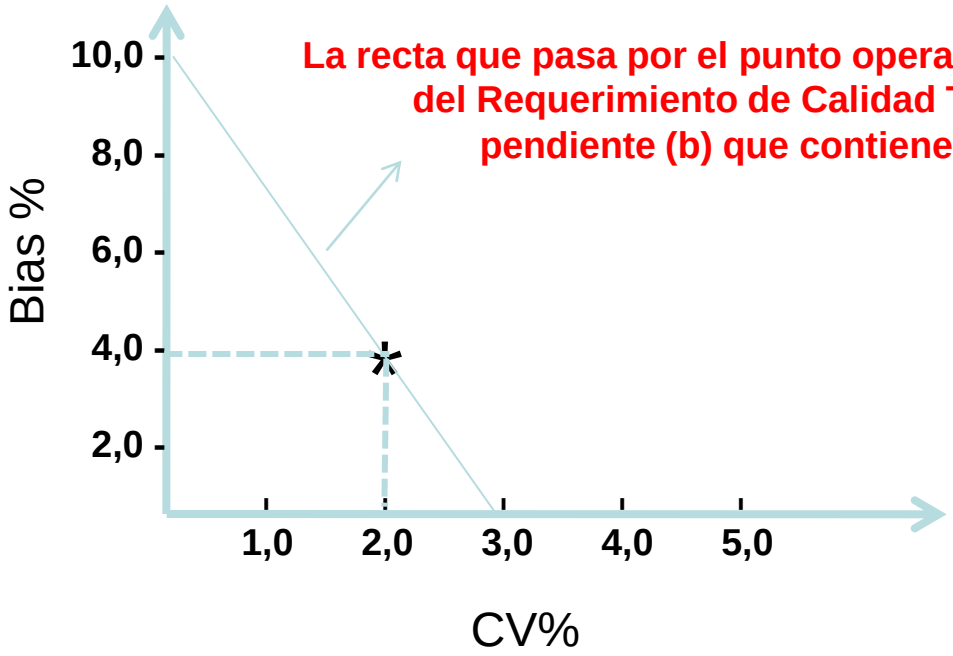
Cartas ó Diagramas de Especificaciones Operativas (OPSpecs Chart)





Cartas ó Diagramas de Especificaciones Operativas (OPSpecs Chart)

Punto Operativo (PO): Punto graficado en un Diagrama OPSpecs que representa el bias del método en "y" y el coeficiente de variación del método en "x". Un procedimiento de Control de Calidad puede construirse a partir de la observación de la ubicación del "PO" respecto a las líneas que representan los límites de imprecisión e inexactitud aceptables para un determinado método. Una regla control apropiada, es aquella en la cual los límites operativos se encuentran por "encima" y más próximo del PO del método.

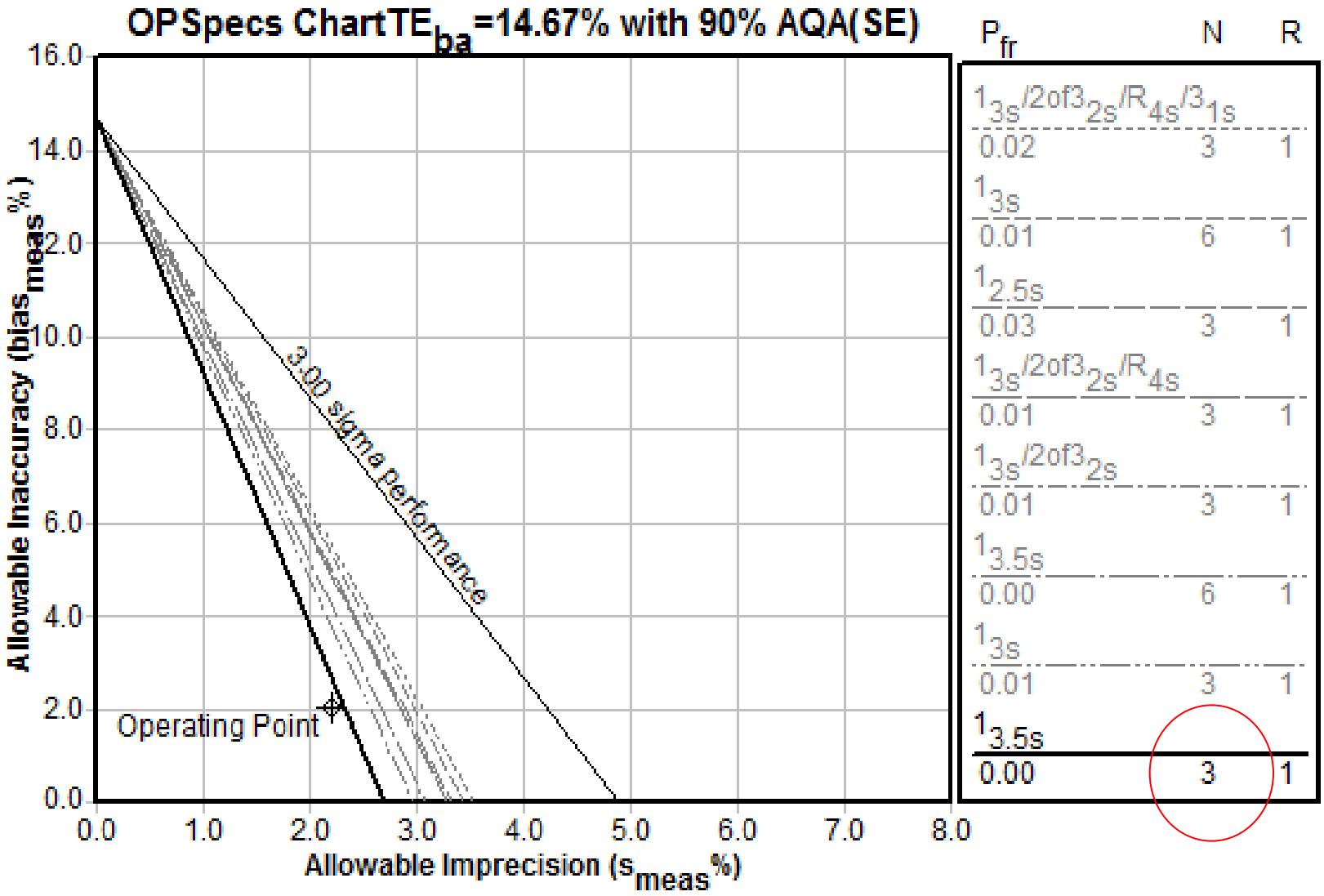


La recta que pasa por el punto operativo del método (∗) y el valor del Requerimiento de Calidad TEa% tiene un valor de pendiente (b) que contiene al ΔSE del método

Ejemplo 1: **Medición de Leucocitos en Sangre Periférica Humana**

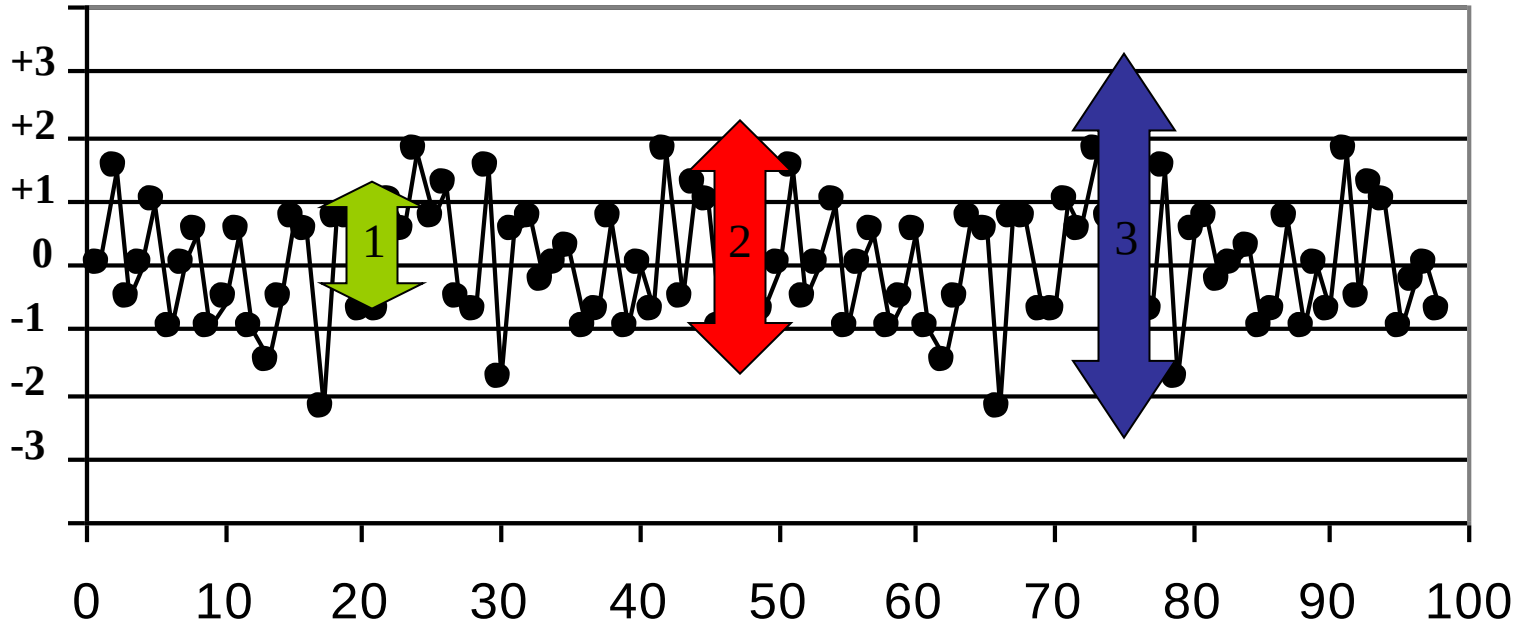
Requerimiento de Calidad TEa = 14,67% (Desiderable Conditions)

Evaluación de Métodos: CV%= 2,2%, Bias%= 2,0%



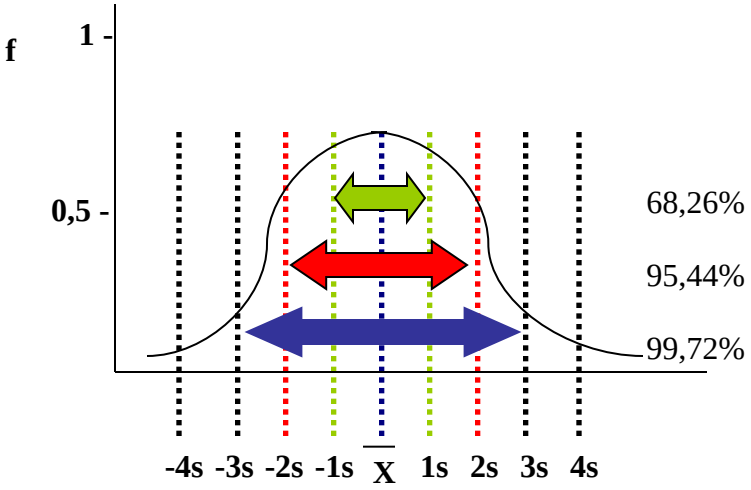
ESTRATEGIA DE CONTROL DE CALIDAD INTERNO

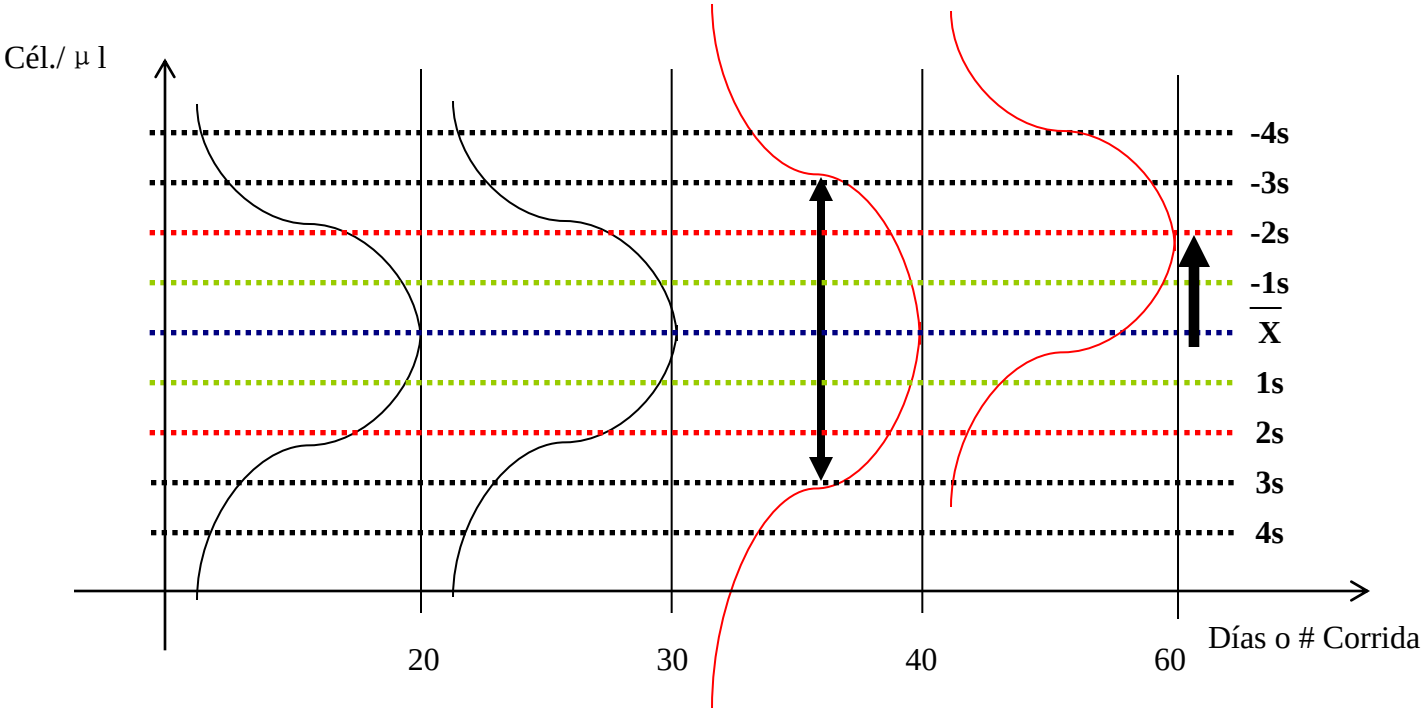
Carta de Control de Calidad con una típica distribución Gaussiana



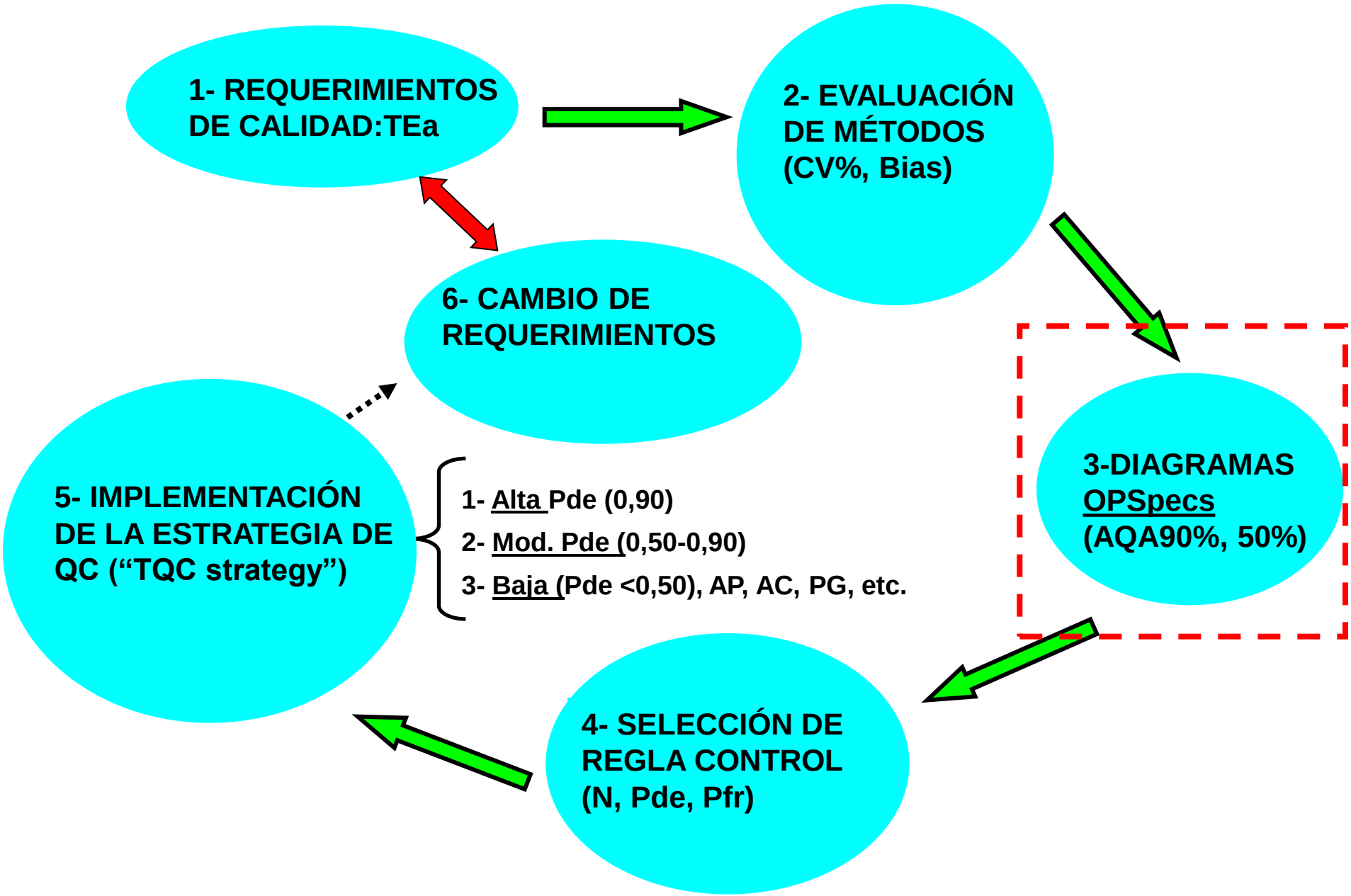
El análisis de todo Control de Calidad depende de la predicción que el sistema de medición producirá la misma distribución de datos.

ESTRATEGIA DE CONTROL DE CALIDAD INTERNO





PROCESO DE PLANIFICACIÓN DEL CONTROL DE CALIDAD


1- REQUERIMIENTOS DE CALIDAD:TEa
2- EVALUACIÓN DE MÉTODOS (CV%, Bias)
3-DIAGRAMAS OPSpecs (AQA90%, 50%)
4- SELECCIÓN DE REGLA CONTROL (N, Pde, Pfr)
5- IMPLEMENTACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE QC ("TQC strategy")
1- Alta Pde (0,90)
2- Mod. Pde (0,50-0,90)
3- Baja (Pde <0,50), AP, AC, PG, etc.
6- CAMBIO DE REQUERIMIENTOS

¿ Cómo asignar la Media y la Desviación Estándar (DE) en una Carta Control ?

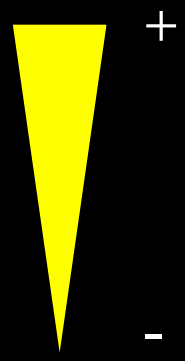
Media:

. Un valor calculado o estimado en base a recientes observaciones

. Un valor promedio de todas las mediciones realizadas en meses previos

Un valor acumulativo a partir de un período de tiempo

. El valor provisto por el fabricante del material control



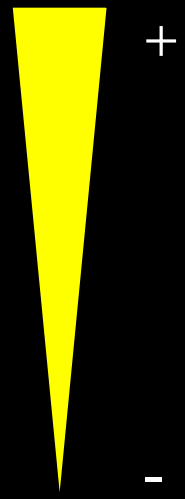
DE:

. Estimada o calculada a partir de datos recientes

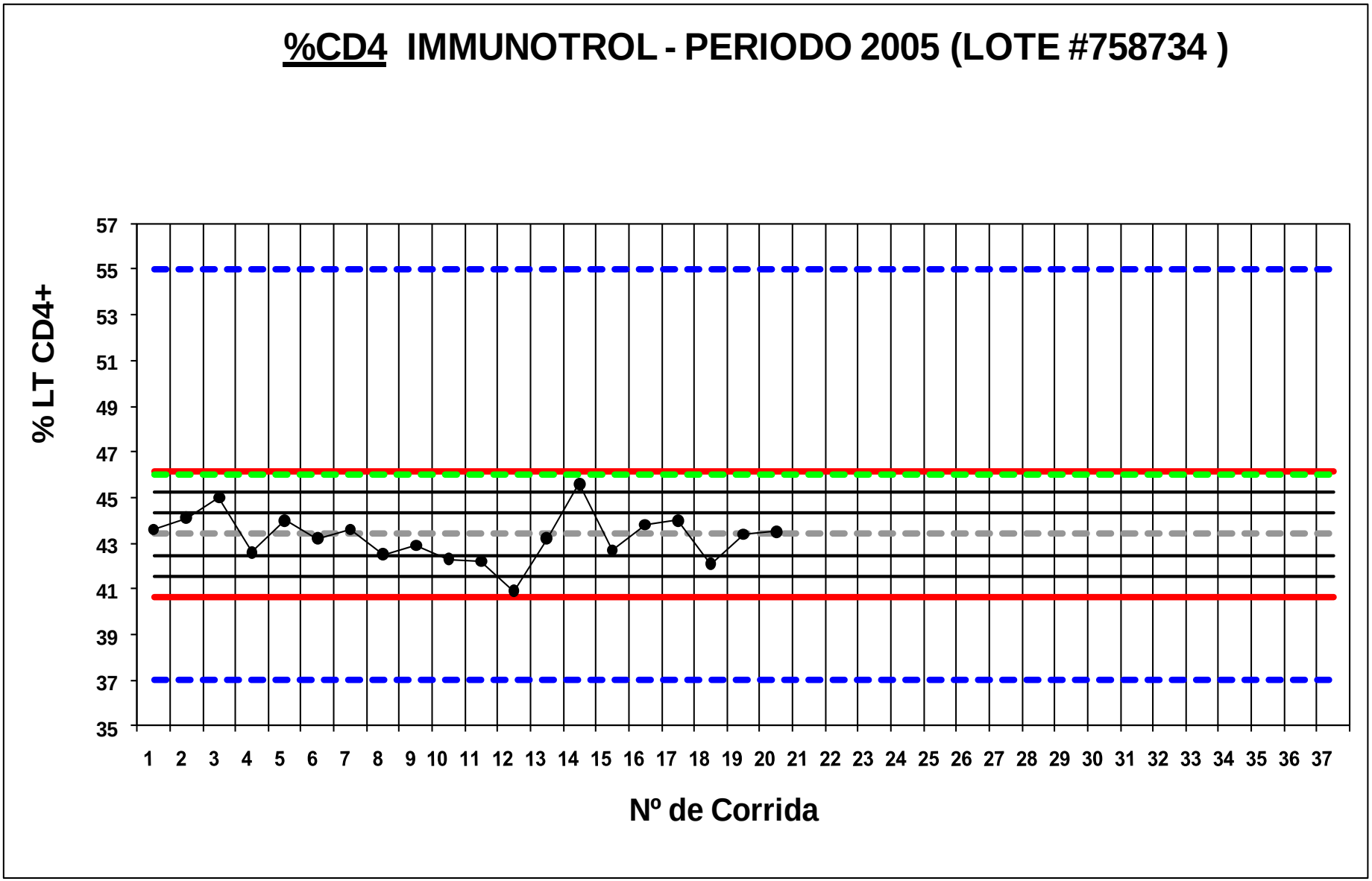
. Acumulativa a partir de un período de tiempo

El valor provisto por el fabricante del material control

. Provisto por literatura o recomendaciones legislativas.



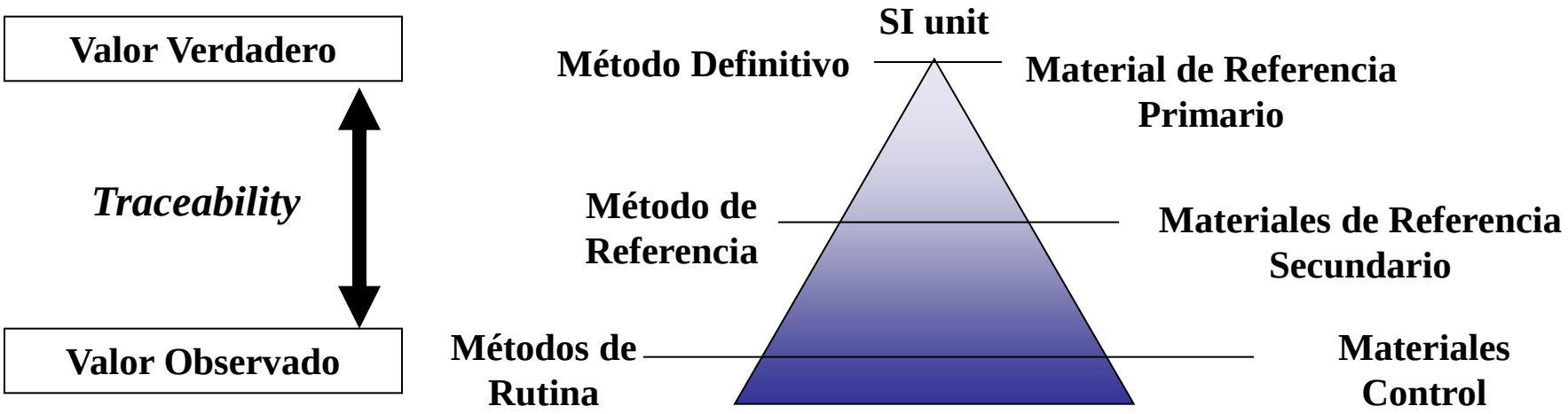
CONTROL DE CALIDAD METODOLÓGICO



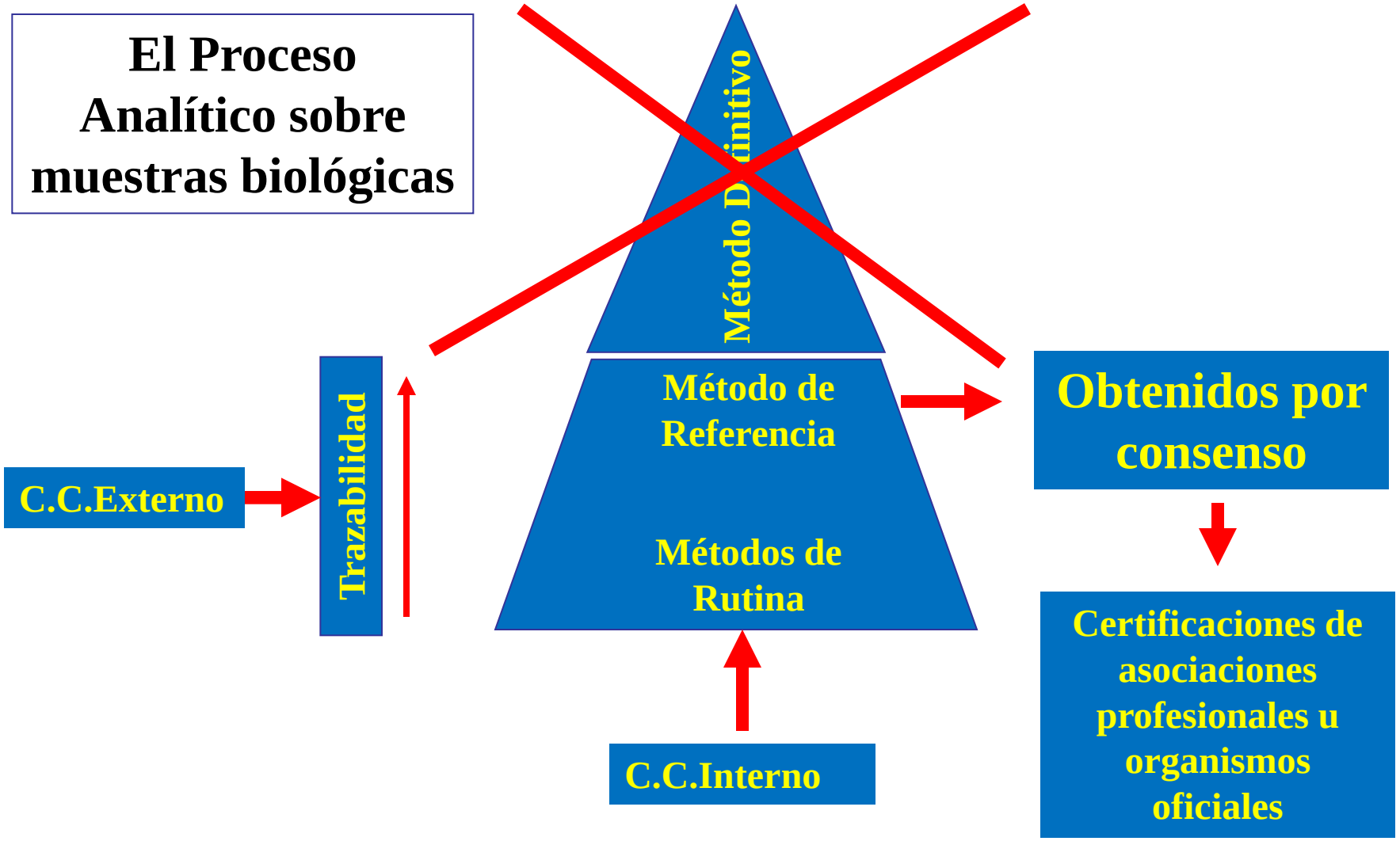
SEGURIDAD ANALÍTICA DE UN SISTEMA DE MEDICIÓN

Exactitud

JERARQUÍA DEL SISTEMA DE MEDICIÓN



Exactitud


El Proceso Analítico sobre muestras biológicas
Método Definitivo
Método de Referencia
Métodos de Rutina
Obtenidos por consenso
Certificaciones de asociaciones profesionales u organismos oficiales
C.C.Externo
Trazabilidad
C.C.Interno

Ensayos de Aptitud Interlaboratorio ("Proficiency Testing")

Los ensayos intralaboratorio no permiten determinar la exactitud de los métodos durante el procesamiento de las muestras

El laboratorio necesita comparar sus resultados con el valor correcto o verdadero

- **Valor verdadero :** valor en consistencia con la definición de una magnitud (concepto abstracto, no realizable).

- **Valor asignado o valor de referencia:** es el valor ***convencionalmente*** verdadero.

- **Exactitud de una medición:** Proximidad entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mensurando.

<u>Cálculo del valor de referencia o valor asignado:</u>

Uso los valores obtenidos por un método de referencia

Uso un material de referencia certificado.

Uso el ***valor medio obtenido por un grupo de laboratorios*** (luego de eliminar los outliers)

Ensayos de Aptitud Interlaboratorio ("Proficiency Testing")

¿Cómo se reportan los resultados de los ensayos de aptitud?

La puntuación Z (Z score) es el estadístico más ampliamente utilizado para evaluar la aptitud de los métodos de un laboratorio

$$Z = \frac{X_{LAB} - X_{REF}}{S_{REF}}$$

X_{LAB} = Resultado del Lab

X_{REF} = Valor de Referencia o Asignado

S_{REF} = Desviación estándar

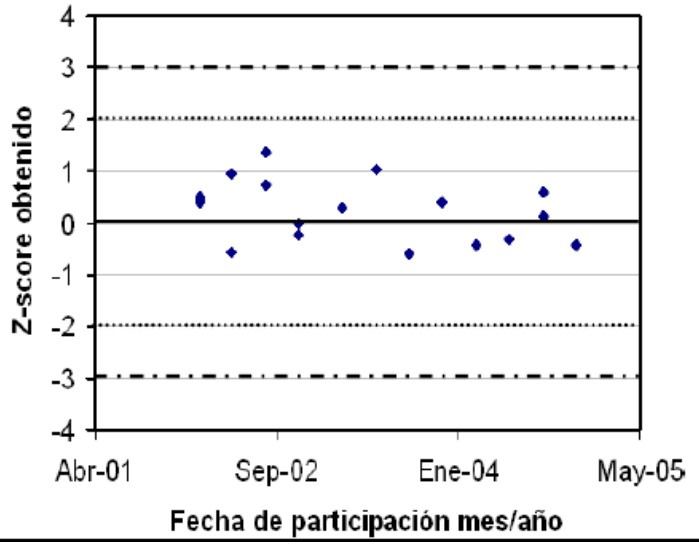
Generalmente corresponden a los resultados del grupo de laboratorios

Cuando z presenta una distribución normal (valor medio de cero y una desviación estándar unitaria) se establece la siguiente clasificación:

$|Z| \leq 2$: Satisfactorio

$3 < |Z| < 2$: Cuestionable

$|Z| > 3$: No satisfactorio



Control de Calidad Interno	Control de Calidad Externo
Las mediciones se realizan durante la rutina diaria	Las mediciones se realizan en fechas estipuladas por el proveedor
Los controles utilizados poseen valores conocidos	Las muestras utilizadas no poseen valores conocidos (muestras ciegas)
Se miden y procesan generalmente 2 datos (uno de alta concentración y uno de baja concentración)	Se mide generalmente un solo dato y el procesamiento es realizado por el proveedor
La detección de errores y toma de decisiones ocurre cada día durante las corridas analíticas	La detección de errores y toma de decisiones ocurre cuando se recibe el informe del proveedor

CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL

- Se colectó la muestra correctamente (anticoag, horario, etiquetas, etc)
- Preparación de la muestra, almacenamiento, transporte, temperatura.
- Elección del instrumento

preanalítico

- Seteo y calibración del instrumento.
- Ac Mo a usar, flurocromos Ac Mo
- Sistema de lisis, calidad de la lisis. Tiempo máximo entre colecta y análisis
- Recolección de datos apropiados.

analítico

- Interpretación de los datos
- Presentación gráfica e impresa (informe).

Post analítico

Procesamiento Hematológico de la muestra

Causas de error en la extracción de sangre

- Tiempo excesivo de ligadura (hemoconcentración)
- Anticoagulante (proporción) inadecuada
- Extracción dificultosa, contaminación con factores hísticos
- Tubos de recolección sucios o húmedos
- Fraccionamiento brusco, hemólisis
- Homogenización inadecuada: hemólisis (excesiva), microcoagulos
- Errores en la rotulación: nombre, código, fecha
- Punción digital, excesiva presión
- Tubos al vacío, llenado insuficiente

Procesamiento Hematológico de la muestra

Anticoagulantes

Sales de EDTA:

1. **EDTA-K_2 (1,5-2,2 mg/ml)**
2. **EDTA-K_3 (1,5-2,2 mg/ml)**
3. **EDTA-Na_2 (1,5-2,2 mg/ml)**

Citrato de Sodio

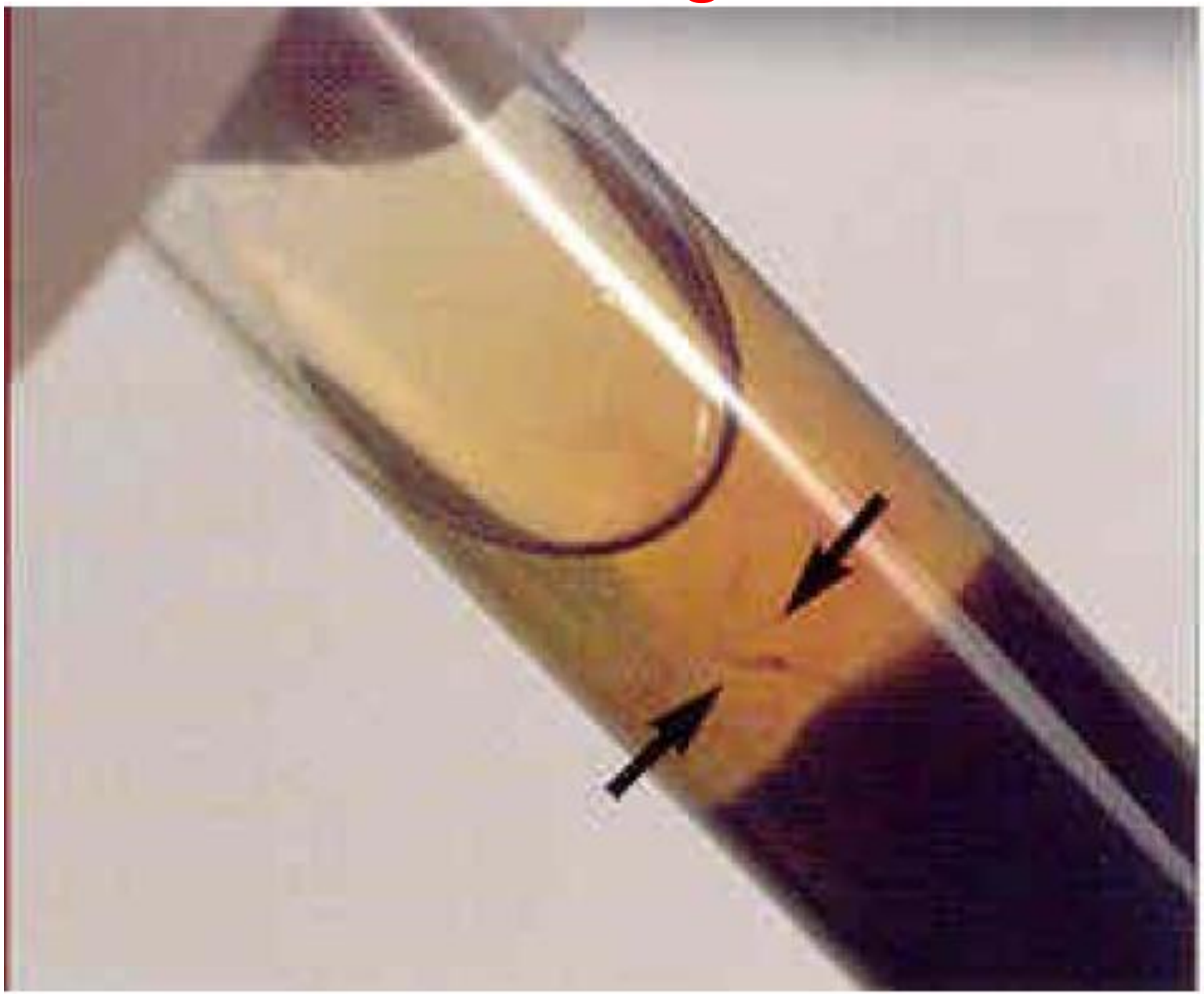
1. 3,2% (0,109M)
2. 3,8% (0,129M)

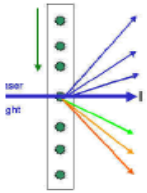
Heparina

1. 15-20 U/ml *(no se recomienda)*

Presencia de Microcoágulos

Presencia de Microcoágulos



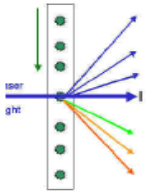


LABORATORIO DE CF

Puesta a punto y Calibración

- **Service (cada 6 meses):** Optimización de la alineación óptica, laser power, PMT y eficiencia electrónica.

- **Validación diaria del instrumento:** Asegura que la medida de los parámetros de fluorescencia y dispersión sea lo más cercana posible a las obtenidas después del service.



LABORATORIO DE CF

Puesta a punto y Calibración

- **Service (cada 6 meses):** Optimización de la alineación óptica, laser power, PMT y eficiencia electrónica.

- **Validación diaria del instrumento:** Asegura que la medida de los parámetros de fluorescencia y dispersión sea lo más cercana posible a las obtenidas después del service.

- **Monitoreo longitudinal de los distintos parámetros:**
  Registro diario de valores medios y CV's en una carta Levey-Jennings y la eventual indicación de un servico técnico si los valores caen FUERA de los límites de tolerancia predefinidos.

- **Documentación y optimización para la máxima sensibilidad de las fluorescencias**
  Despues de cada service, establecer para cada detector de fluorescencia los PMT que aseguren la maxima sensibilidad y resolución.

- **Calibración de fluorescencia:**
  Asegura la reproducibilidad y estabilidad de las medidas de intensidad de fluorescencia. Establece una relación fija entre las unidades arbitrarias del instrumento y valores predefinidos de fluorescencia.

CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL

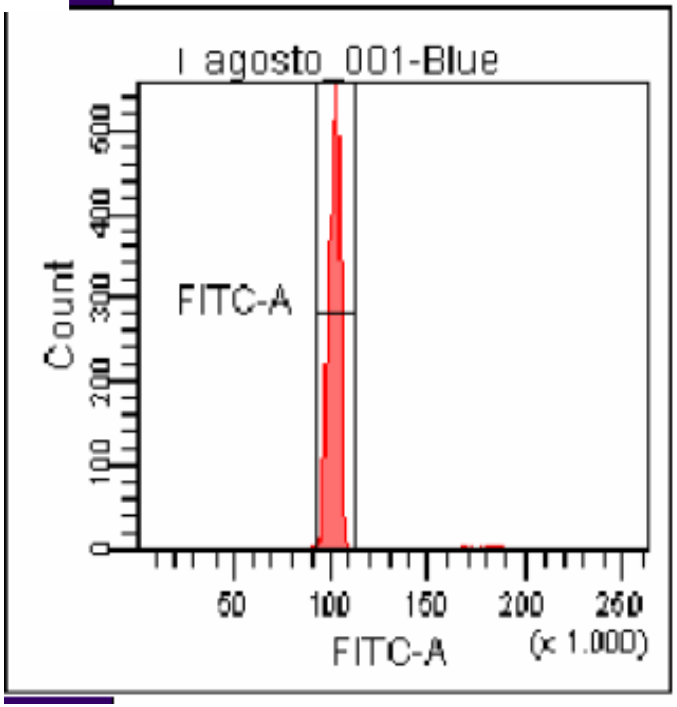
- Se utilizan partículas plásticas con fluorocromos (Beads) capaces de excitarse con los lasers del citómetro y emitir en las longitudes de onda de los distintos detectores.
- Partículas con diferentes intensidad de fluorescencia (1 o mas picos) y disponibilidad de diferentes tamaños (2,3, 6µn)
- Control de: -Calibración de lasers y **Time Delay**
  -Optimización de voltajes
  -Sensibilidad de detección
  -Linealidad
- Cada laboratorio debe determinar sus condiciones de aceptación o rechazo del control

CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL

- Ajuste del voltaje para que el valor del control permanezca igual. Se mide de la variación de parámetros del equipo (Voltajes , CV, SD…).

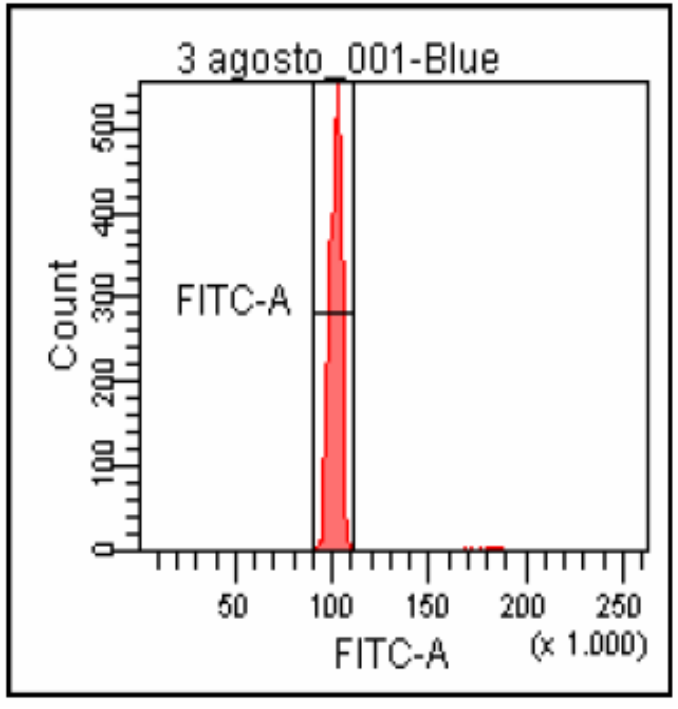
Population	FITC-A Mean	FITC-A %CV
FITC-A	100	2,6

Voltaje FITC 605v



Population	FITC-A Mean	FITC-A %CV
FITC-A	100	2,6

Voltaje FITC 612v

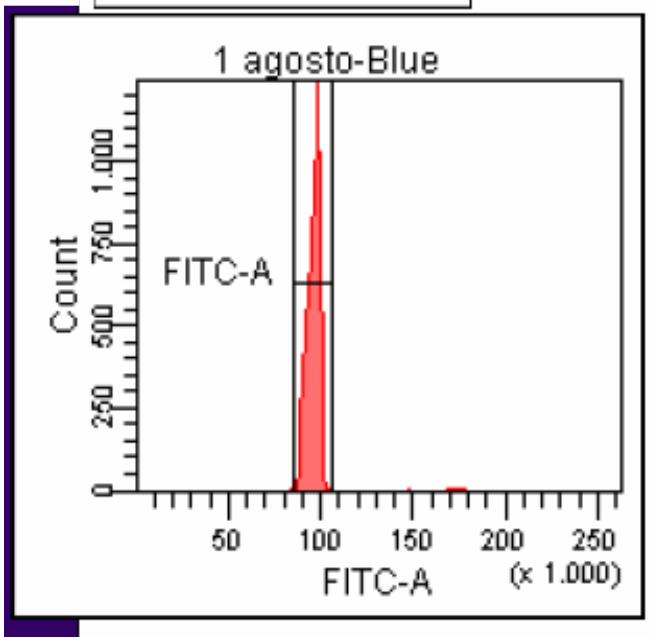


CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL

Medición del corrimiento diario del control, manteniendo fijo los parámetros del equipo.

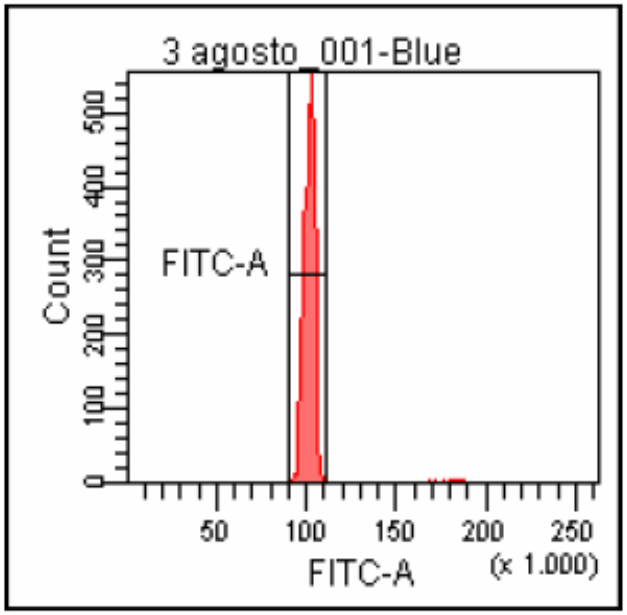
Population	FITC-A Mean	FITC-A %CV
FITC-A	95.490	3,2

Voltaje FITC 612v



Population	FITC-A Mean	FITC-A %CV
FITC-A	100.992	2,6

Voltaje FITC 612v



CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL

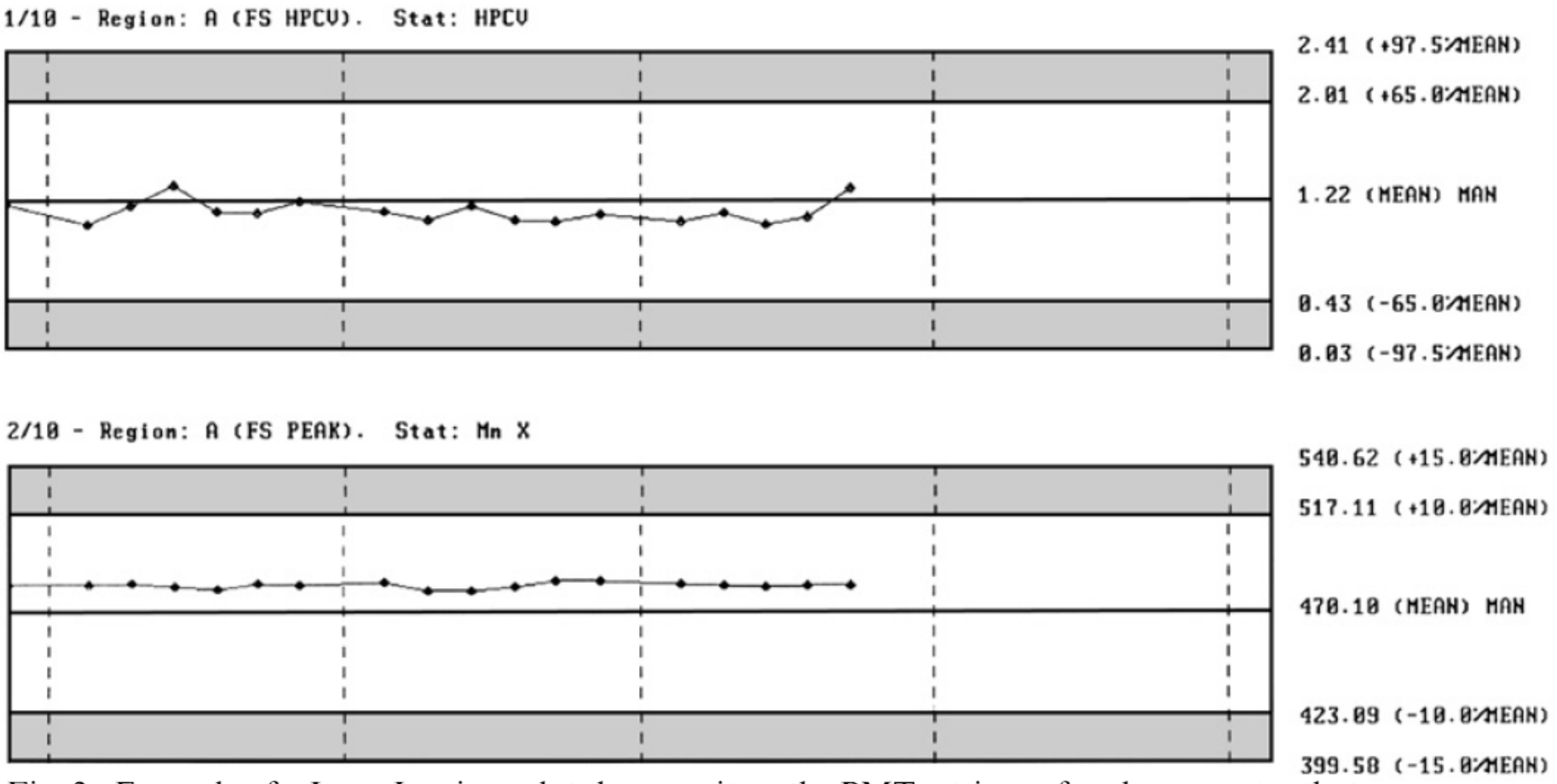


Fig. 2. Example of a Levy-Jennings plot that monitors the PMT settings of each parameter that places the beads into a set target range. Longitudinal display of PMT settings can identify potential instrument problems.

Clin Lab Med 27 (2007) 671–685

CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL

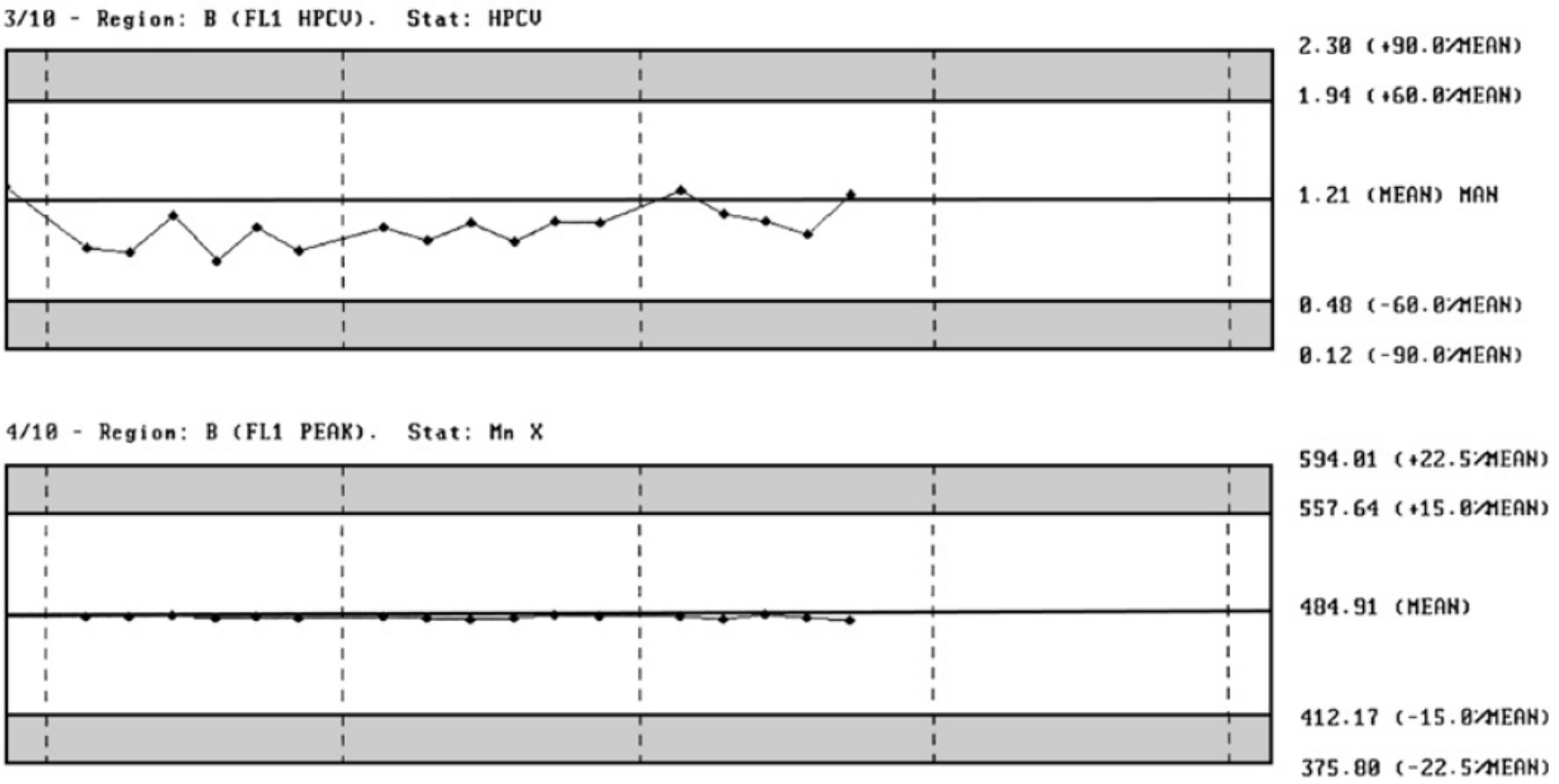


Fig. 2. Example of a Levy-Jennings plot that monitors the PMT settings of each parameter that places the beads into a set target range. Longitudinal display of PMT settings can identify potential instrument problems.

Clin Lab Med 27 (2007) 671–685

CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL

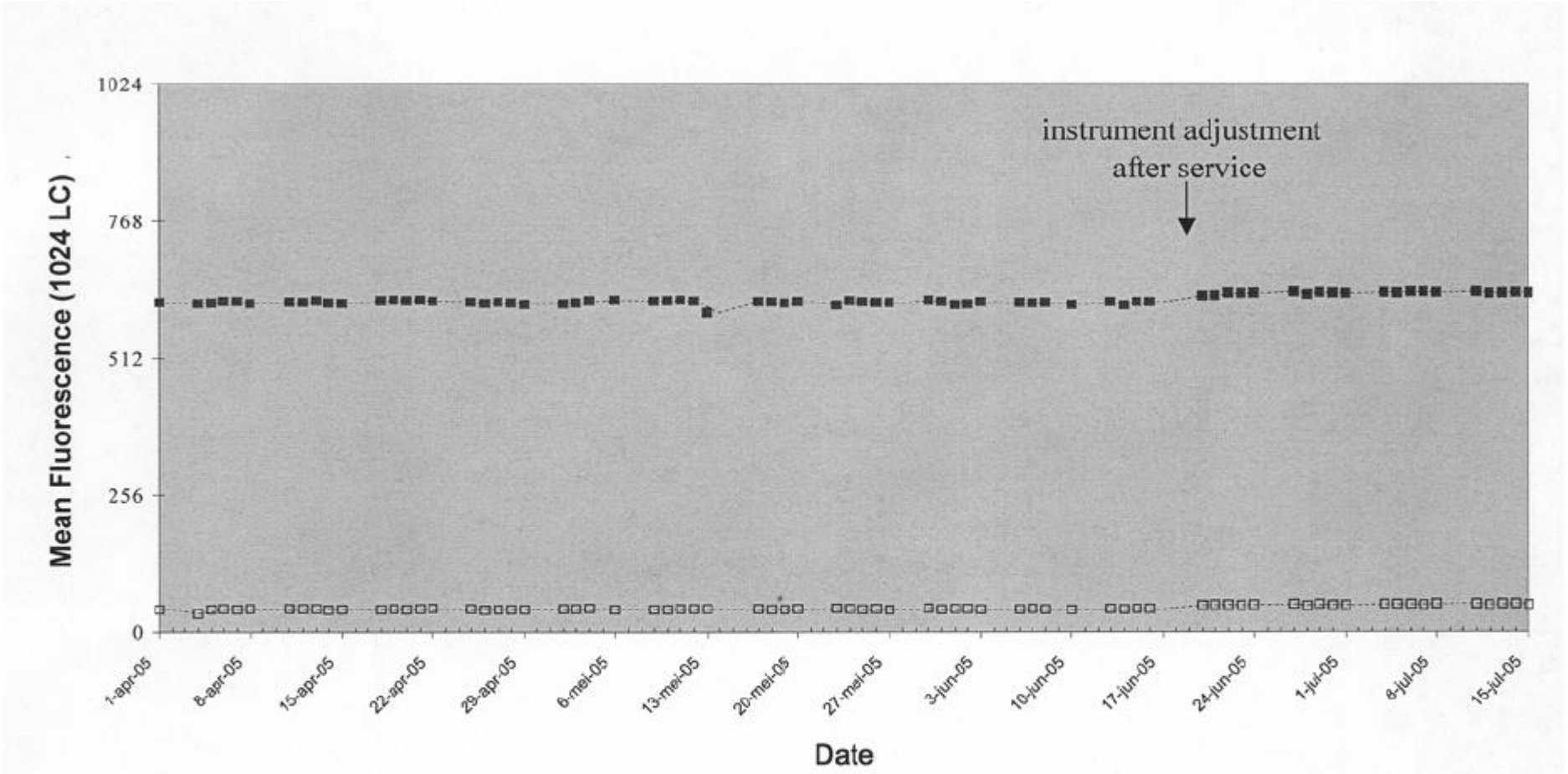


Figure A3-2. Strategy 2: mean fluorescence intensity of a blank bead (open squares) and fluorescent reference beads (closed squares) for an FL channel monitored under constant instrument conditions (i.e., constant FL detector high voltage/gain settings, compensation settings). The instrument was serviced on 19 June 2005, after which its settings were changed.

CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL

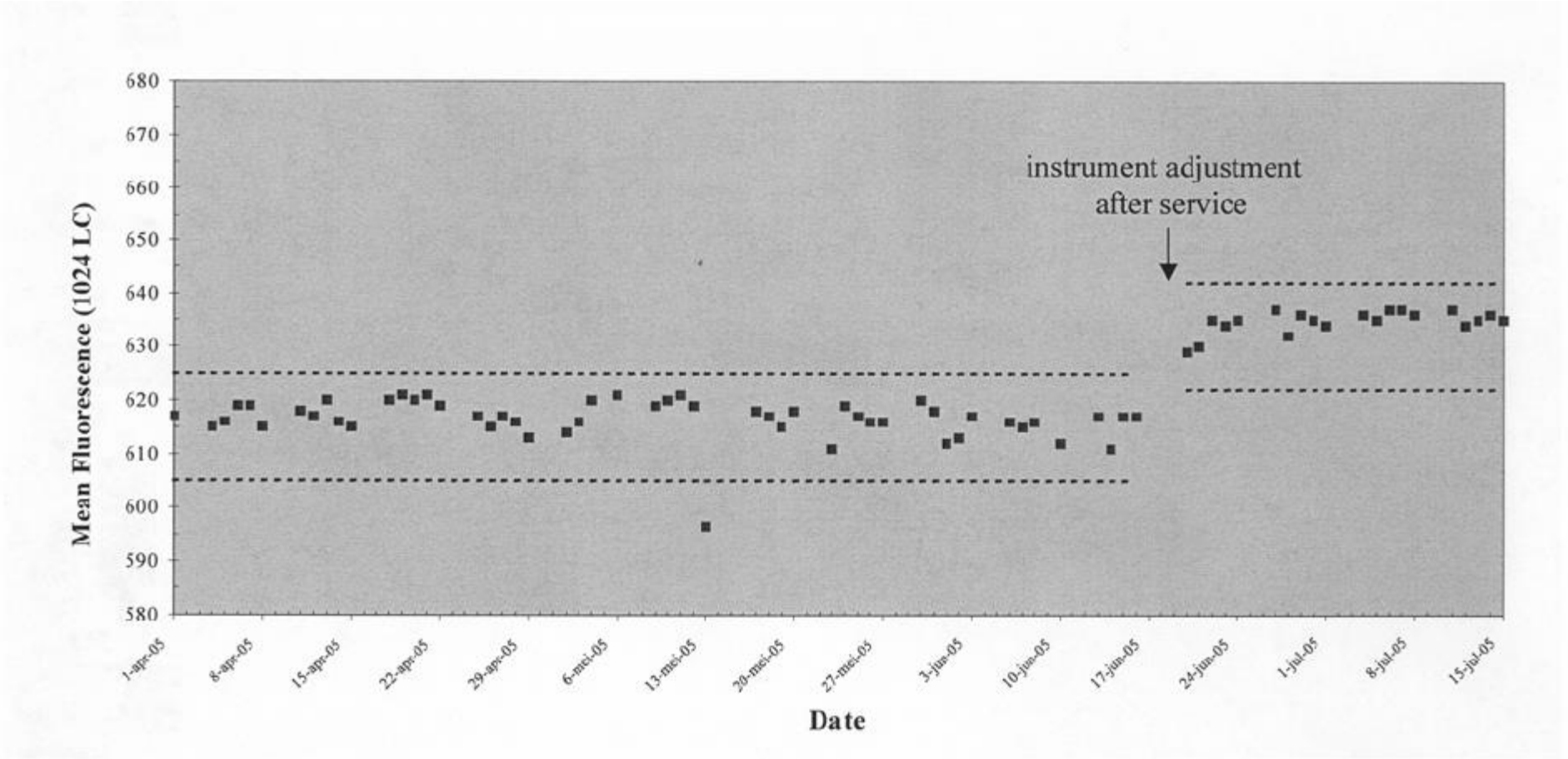
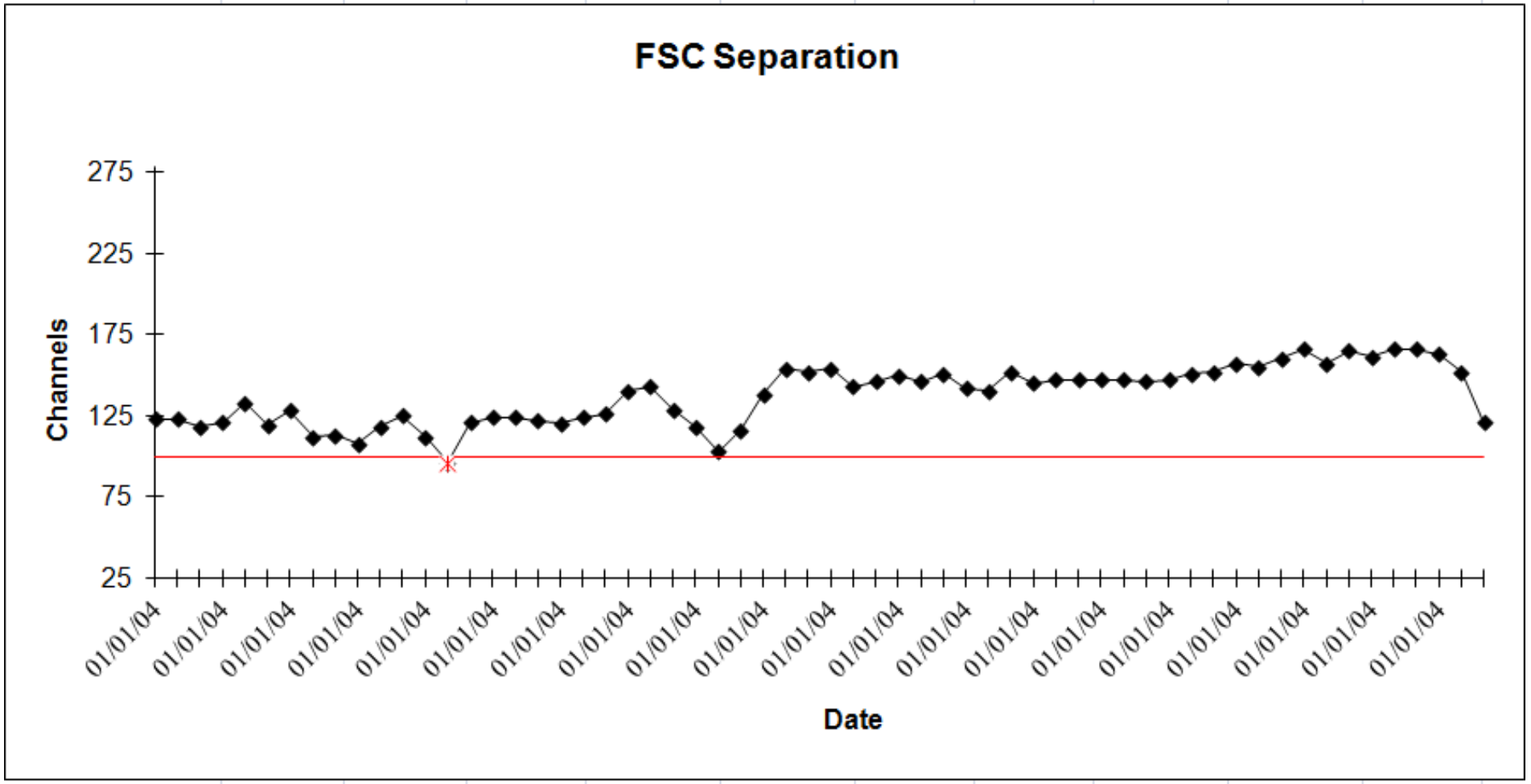
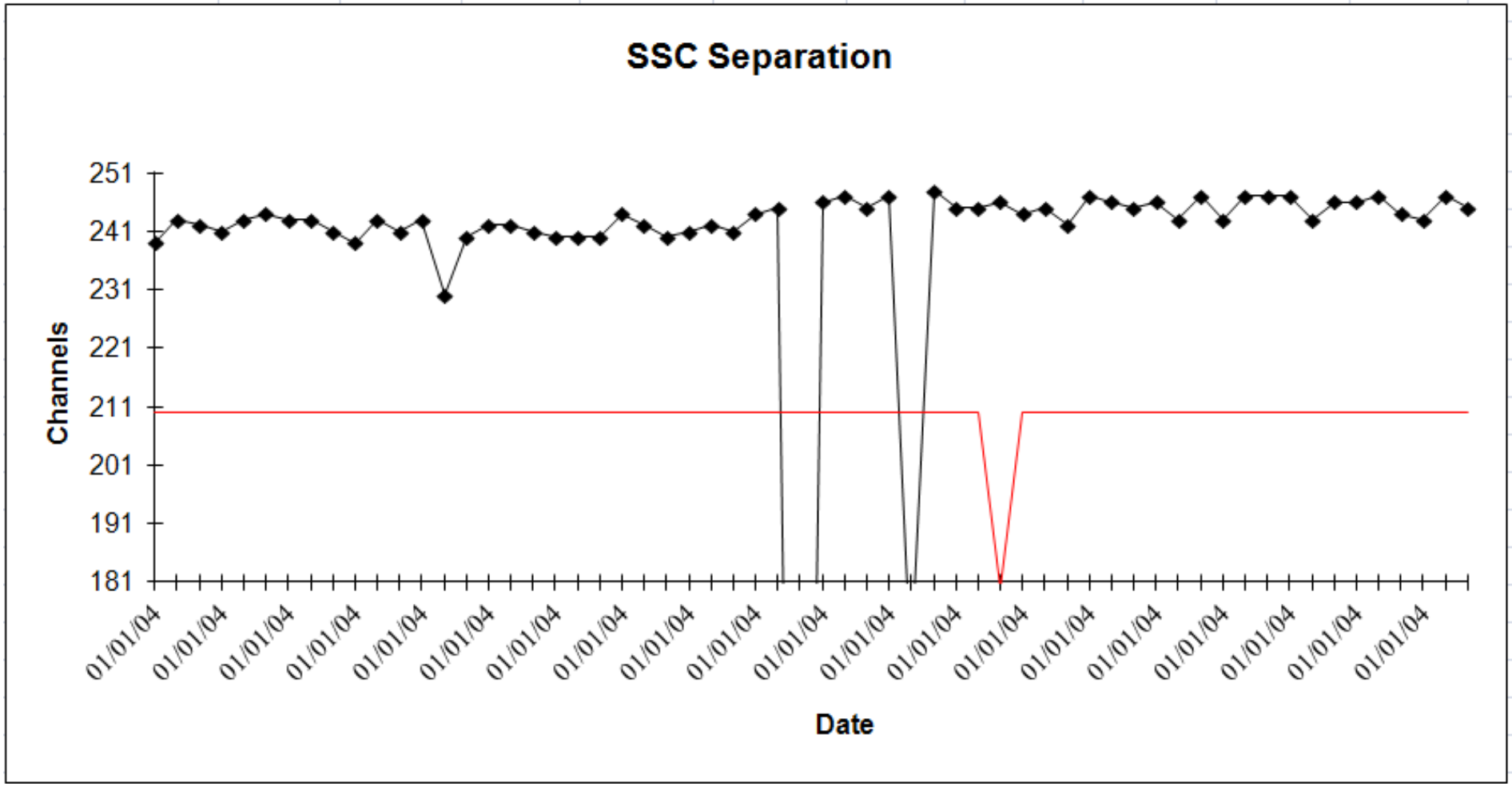


Figure A3-3. Magnification of the data on the fluorescent reference beads in Figure A3-2. The dashed lines indicate the established tolerance zones (mean ± 10 channels; 1024-channel linear histogram scale). The out-of-range value obtained on 13 May 2005 was related to temporary blockage of the instrument's flow cell, which was solved by simple rinsing.

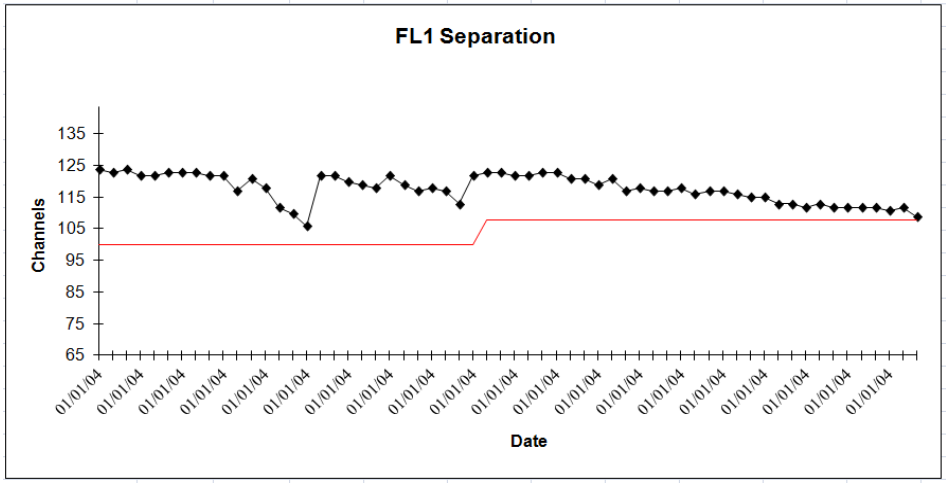
CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL

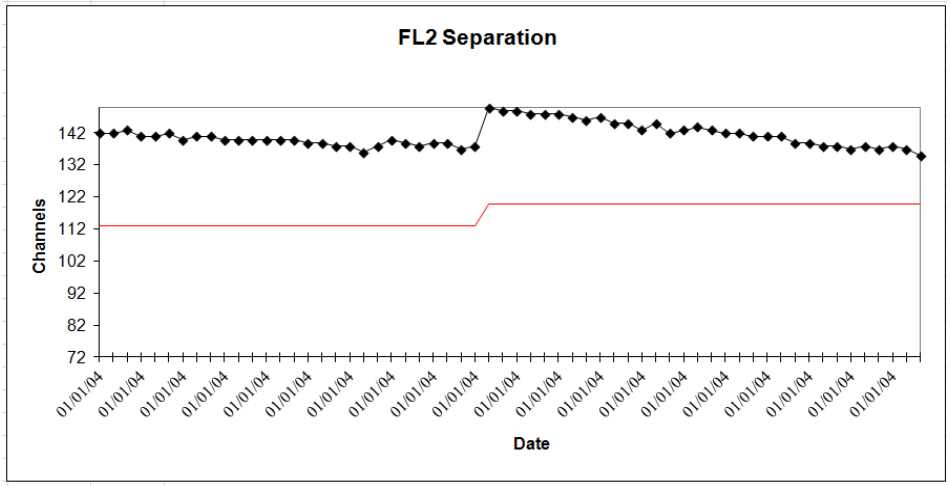


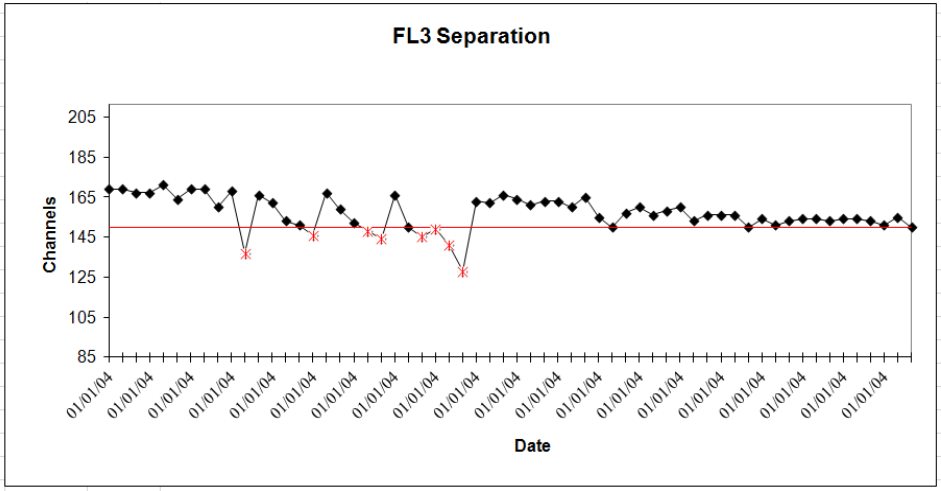
CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL



CONTROL DE CALIDAD INSTRUMENTAL







Gracias por su atención ...

e-mail: cesarcollino2013@gmail.com

graduados@fcq.unc.edu.ar